

**Entwicklung neuer DNA Extraktionsmethoden zur
Verbesserung der Detektion von *Mycobacterium-
tuberculosis*-Komplex-Mitgliedern aus Gewebeproben von
Rind und Rotwild**

Von Shari Fabienne Fell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Entwicklung neuer DNA Extraktionsmethoden zur
Verbesserung der Detektion von *Mycobacterium-
tuberculosis*-Komplex-Mitgliedern aus Gewebeproben von
Rind und Rotwild**

Von Shari Fabienne Fell

aus Haltern am See

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Korreferent/en: Prof. Dr. Sabine André
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke
Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger
Priv.-Doz. Dr. Karin Weber

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Für meine Eltern

Der Vorteil der Klugheit besteht darin, dass man sich dumm stellen kann.

Das Gegenteil ist schon schwieriger.

Kurt Tucholsky (1890 – 1935)

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	4
1	<i>Mycobacteria</i> spp.	4
1.1	Taxonomie und Nomenklatur.....	4
1.2	Morphologie und mikrobiologische Eigenschaften	6
2	Der <i>Mycobacterium-tuberculosis</i>-Komplex (MTC)	9
2.1	Mitglieder des MTC	10
2.2	Virulenz	12
2.2.1	Aufnahme in die Zielzellen	12
2.2.2	Überleben in Makrophagen	12
2.2.3	Zellwandbestandteile als Pathogenitätsfaktoren	13
2.3	Tenazität	14
2.4	Besonderheiten des Genoms von MTC-Mitgliedern	15
3	Die Erreger der Rindertuberkulose.....	17
3.1.1	<i>Mycobacterium bovis</i>	17
3.1.2	<i>Mycobacterium caprae</i>	18
3.1.3	Unterschiede und Gemeinsamkeiten von <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i>	20
4	Rindertuberkulose - Epidemiologie	21
4.1	Vorkommen und Bedeutung als Zoonose	21
4.2	Rindertuberkulose in Deutschland, Österreich und der Schweiz	22
5	Infektion und Pathogenese	25
5.1	Übertragung und Infektion	25
5.2	Pathogenese	26
6	Immunologie	31
6.1	Zelluläre Immunantwort.....	31
6.2	Humorale Immunantwort	33
6.3	CMI basierende Diagnostik für bovine Tuberkulose	33
7	Klinik	35
8	Therapie	36
8.1	Therapie und Prophylaxe des Menschen.....	36

8.2	Therapie der Haussäugetiere	37
9	Bekämpfung in Deutschland	37
10	Diagnostik	39
10.1	Verdachtsdiagnose	39
10.1.1	Klinische Untersuchung	39
10.1.2	Pathologisch-anatomische Untersuchung	40
10.2	Indirekter Erregernachweis	40
10.2.1	Intrakutan-Test	41
10.2.2	Interferon-Gamma-(IFN- γ -) Test	43
10.2.3	Antikörper-Nachweis	44
10.3	Direkter Erregernachweis.....	45
10.3.1	Mikroskopischer Nachweis	45
10.3.2	Kultureller Nachweis.....	46
10.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
10.3.3.1	DNA Extraktion	47
10.3.3.2	Real-time PCR.....	47
11	Magnetische Separation als Nachweisverfahren.....	48
11.1	Prinzip der magnetischen Separation	48
11.2	Anforderungen an die magnetischen Partikel	49
11.3	Immunomagnetische Separation	50
11.3	Magnetische Separation von Nukleinsäuren	51
III	PUBLIKATION	54
IV	DISKUSSION	69
1	Der Einsatz alternativer Extraktionsverfahren aus größeren Probenvolumina zur Verbesserung der Diagnostik der bovinen Tuberkulose	71
2	Schwächen und Voraussetzungen für die neuen Extraktionsverfahren.....	73
3	Probleme bei der Quantifizierung von Mykobakterien.....	76
4	Direkter Vergleich der Extraktionsmethoden anstelle von Angabe der Sensitivität und Spezifität der neuen Protokolle	78
5	Verbesserung der Differenzierung von <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> mittels	

	real-time PCR	80
6	Ausblick.....	82
V	ZUSAMMENFASSUNG	84
VI	SUMMARY	86
VII	LITERATURVERZEICHNIS	88
VIII	ANHANG	123
IX	DANKSAGUNG	132

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AcPim ₆	Acylphosphatidylinositolhexamannosid
AG	Arabinogalactan
APC	antigen presenting cell
BCG	Bacille Calmette-Guérin
bP	Basenpaar
bTB	Bovine Tuberkulose
CFU	Colony forming unit
CMI	cell mediated immunresponse
DIM	Phthioceroldimycocerosate
DNA	desoxyribonucleic-acid/Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMB	Ethambutol
Fe ²⁺	Eisen-Ion
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
HELI	Helicase
IFN- γ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMS	Immunomagnetische Separation
INH	Isoniazid
IS	Insertionselement
kB	Kilobase (1000 bp)
KbE	Koloniebildende Einheit
LAM	Lipoarabinomannan
LM	Lipomannan
LNA	locked nucleic acids
LOSS	Lipooligosaccharide
MAC	<i>Mycobacterium-avium</i> -complex
MC	magnetic capture
MCH	magnetic capture hybridization
MDR-TB	multidrug-resistant tuberculosis
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MOTT	Mycobacteria other than tubercle bacilli
MTC	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -complex

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NTM	Nicht tuberkulöse Mykobakterien/ nontuberculous mycobacteria
NVL	non visible lesions
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OD	Optische Dichte/optical density
OIE	Office International des Epizooties
OTF	officially tuberculosis-free
PBS	phosphate buffered saline/ phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PI	Phosphatidylinositol
PIM	Phosphatidylinositolmannosid
PPD	purified protein derivate(s)
PZA	Pyrazinamid
RD	region of difference
RMP	Rifampicin
RNA	ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffverbindungen
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
SCCIT	single comparative cervical intradermal tuberculin
SL	Sulfolipide
SM	Streptomycin
SNP	single nucleotide polymorphism
Sod	Superoxiddismutase
TB	Tuberkulose
TDM	Trehalose 6,6'-Dimycolat
TH-Zelle	T-Helferzelle
TSN	Tierseuchennachrichten-System
VL	visible lesions
WHO	World Health Organization
XDR-TB	extensively drug-resistant tuberculosis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus der Mykobakterien	7
Abbildung 2: Kulturelles Wachstum von <i>M. bovis</i> BCG auf dem Schrägagar.....	8
Abbildung 3: Kulturelles, pilzähnliches Wachstum von <i>M. bovis</i> BCG.....	9
Abbildung 4: Aktualisierter phylogenetischer Stammbaum des MTC.....	16
Abbildung 5: Geografische Verteilung der Rindertuberkulosefälle in Deutschland in den Jahren 2013 bis 2015	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Granuloms in unterschiedlichen Stadien bei der Tuberkulose des Menschen	28
Abbildung 7: Granulomatöse Veränderung in einem Lymphknoten eines mit <i>M. caprae</i> infizierten Rindes, Januar 2014.....	29
Abbildung 8: Mesenterial-Lymphknoten eines Rindes mit boviner Tuberkulose.....	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung der CMI basierenden diagnostischen Möglichkeiten für Tuberkulose	34
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Spektrums der Immunantworten des Immunsystems des Rindes und die verschiedenen indirekten Tuberkulose-Testverfahren.....	41
Abbildung 11: Illustration der verschiedenen Möglichkeiten um Antikörper an Magnetpartikel zu binden	50
Abbildung 12: Illustration der verschiedenen Möglichkeiten um Nukleinsäuren an Magnetpartikel zu binden	51
Abbildung 13: Darstellung des Prinzips des Magnetic Capture Verfahrens.....	74
Abbildung 14: In der Studie verwendete Materialien für den mechanischen Aufschluss der Gewebeproben	76
Abbildung 15: Struktur von RNA und LNA im Vergleich.....	81

Abbildungsverzeichnis Anhang

Abbildung A 1: Nach Ziehl-Neelsen gefärbter Ausstrich eines Sedimentes, welches zuvor mittels real-time PCR als MTC-DNA positiv detektiert wurde.....	123
Abbildung A 2: Mit Auramin-Rhodamin gefärbter Ausstrich eines Sedimentes, welches zuvor mittels real-time PCR als MTC-DNA positiv detektiert wurde.....	124

Abbildung A 3: Amplification plots der real-time PCR zur Differenzierung von <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> der Feldproben der MC 1 – 15.....	125
Abbildung A 4: Amplification plots der real-time PCR zur Differenzierung von verschiedenen <i>M.-bovis</i> - und <i>M.-caprae</i> -Isolaten.....	126
Abbildung A 5: Ziehl-Neelsen gefärbter Ausstrich von <i>M. bovis</i> BCG	127
Abbildung A 6: Ziehl-Neelsen gefärbter Ausstrich von <i>M. bovis</i> BCG nach Filtration.....	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SNPs zur Speziesdifferenzierung von <i>M. caprae</i> und <i>M. bovis</i>	20
Tabelle 2: Amtlich dokumentierte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Deutschland, Jahresstatistik 2005 - 2016	23

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle A 1: Sequenzen für Primer und Sonde aus der Amtlichen Methodensammlung und der neuen, um zwei Basen verkürzten LNA Probe.....	129
Tabelle A 2: C _t -Werte im Vergleich bei Anwendung der Sonde nach der Amtlichen Methodensammlung und der neu designten LNA Probe.....	130
Tabelle A 3: Ergebnisse der Vorversuche zur Etablierung der Magnetic Capture Methode	131

I EINLEITUNG

Die Tuberkulose (Tb) ist eine in den Industrieländern schon fast vergessene Krankheit. Tatsächlich hat diese Krankheit jedoch noch heute eine große Bedeutung als Infektionskrankheit und als Zoonose. Die World Health Organization (WHO) gibt an, dass die humane Tuberkulose nach HIV/AIDS weltweit die Infektionskrankheit mit den meisten Todesfällen ist. Es wird geschätzt, dass ein Drittel der Weltbevölkerung mit den Erregern der Tuberkulose infiziert ist, jedoch häufig zeitlebens nicht erkrankt (WHO, 2015).

Tuberkulose wird durch Mitglieder des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) ausgelöst. Zu diesem gehören auch die Erreger der Rindertuberkulose (bovine Tuberkulose, bTB), *Mycobacterium bovis* und *M. caprae* (SELBITZ et al., 2015). Die Rindertuberkulose verursacht weltweit erhebliche volkswirtschaftliche Schäden durch verminderte Tiergesundheit, Produktivitätseinbußen und erforderliche Bekämpfungsmaßnahmen zum Schutz von Tier und Mensch. Sie gilt in Deutschland als anzeigepflichtige Tierseuche und wird staatlich bekämpft (TIERSEUCHANZV, 1991; FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2014). Seit dem Jahr 2008 werden wieder vermehrt Rindertuberkulosefälle, die in Süddeutschland hauptsächlich durch *M. caprae* verursacht wurden, in der bayrischen und österreichischen Alpenregion festgestellt (DOMOGALLA et al., 2013; FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015).

Die Diagnose der bovinen Tuberkulose ist anspruchsvoll. Der Tuberkulin-Hauttest und der Interferon- γ -Test als indirekte *intra vitam* Nachweise ermöglichen eine Verdachtsdiagnose. Die direkten Nachweise mittels Kultur oder real-time PCR aus Gewebeproben gelten als beweisend (RINDTB-VO, 2014). Die Durchführung der diagnostischen Methoden ist in der „Amtlichen Methodensammlung“ des Friedrich-Löffler-Institutes (FLI) festgelegt (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015). Beim molekularbiologischen Nachweis mittels real-time PCR werden derzeit elf zu testende Gewebeproben auf das Vorkommen von *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex-DNA untersucht. Dabei werden pro Gewebeprobe nur wenige Milligramm Gewebe aufbereitet und zur DNA Extraktion verwendet. Wie allgemein bekannt, stellen die nur sehr geringe Bakterienbelastung und die inhomogene Verteilung im Gewebe in Form von

sogenannten „non visible lesions“ (NVL) in frühen Infektionsstadien und „visible lesions“ (VL) in Form von sich langsam im Krankheitsverlauf entwickelnden Granulomen, Schlüsselprobleme beim PCR-basierten MTC-Genom-Nachweis dar (PARRA et al., 2008). Daher ist es eine besondere Herausforderung, Probenmaterial für die DNA Extraktion zu entnehmen, welches potentiell detektierbare mykobakterielle DNA enthält. So kann es bei „falscher“ Probenentnahme zu falsch-negativen Ergebnissen in der real-time PCR besonders bei Tieren in frühen Infektionsstadien kommen. Daher ist die Entwicklung neuer DNA Extraktionsmethoden essentiell, um die Wahrscheinlichkeit des MTC-DNA-Nachweises aus Gewebeproben zu verbessern (PARRA et al., 2008; RETTINGER et al., 2015).

Ziel dieser Arbeit war es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem DNA aus einem größeren Probenvolumen extrahiert werden kann und so MTC-DNA mit einer höheren Wahrscheinlichkeit in der Gewebeprobe nachgewiesen wird als mit dem amtlich vorgeschriebenen Protokoll. Zu diesem Zweck wurde ein Protokoll etabliert, das es ermöglicht, größere Probenvolumina mechanisch und enzymatisch für die DNA Extraktion aufzubereiten und die im Vergleich zur Menge der Wirts-DNA in deutlich geringerem Umfang in der Probe enthaltene mykobakterielle DNA aus der Probe selektiv anzureichern. Dazu wurde das Prinzip der sogenannten „magnetic capture hybridization“ (MCH) angewendet. Um die Anwendung in der Routinediagnostik zu ermöglichen, wurde zusätzlich ein zweites, vereinfachtes DNA Extraktionsprotokoll entwickelt, welches den Einsatz großer Probenvolumina ermöglicht, ohne das zeitaufwendige Magnetic Capture (MC) Verfahren anwenden zu müssen. Anschließend wurden Gewebeproben von bTB verdächtigen Rindern und Rotwild einerseits mittels des rechtlich vorgeschriebenen Protokolls der amtlichen Methodensammlung, sowie andererseits mit den beiden neu entwickelten Protokollen bearbeitet. Zur Auswertung wurden die C_t -Werte der MTC-spezifischen real-time PCR verwendet. Dafür wurden die C_t -Werte der neu entwickelten Extraktionsmethoden gegen die C_t -Werte der herkömmlichen Methode verglichen.

Dabei konnte anhand einer C_t -Wert-Verbesserung gezeigt werden, dass die Verarbeitung von größeren Probenvolumina mit den beiden neu entwickelten DNA Extraktionsprotokollen zu einer gesteigerten Detektionsrate von MTC-DNA aus Gewebeproben führte. Darüber hinaus konnten mehr Proben positiv oder

fraglich getestet werden, die mit der herkömmlichen Methode negativ waren. Die Ergebnisse der Studie belegen, dass durch die Bearbeitung großer Probenvolumina eine verbesserte MTC-DNA Detektionsrate erreicht werden kann. Damit könnten die in dieser Arbeit entwickelten Methoden dazu beitragen, falsch-negative Ergebnisse in der Routinediagnostik zu reduzieren und zu einer Verbesserung der staatlichen Tierseuchenbekämpfung beitragen.

II LITERATURÜBERSICHT

1 *Mycobacteria* spp.

1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Am 24. März 1882 stellte der deutsche Mediziner und Mikrobiologe Robert Koch bei der Berliner Physiologischen Gesellschaft die Entdeckung des Erregers der Tuberkulose in seinem berühmt gewordenen Vortrag „Aetiologie der Tuberculose“ vor (KOCH, 1882). Dies legte die Grundlage für die weitere funktionale Einteilung der Mykobakterien in den folgenden Jahrzehnten. Die Klassifizierung der Mykobakterien begann 1896, als Lehmann und Neumann vorschlugen, die neu entdeckten Spezies *Mycobacterium tuberculosis*, ursprünglich als *Bacterium tuberculosis* bezeichnet, und *Mycobacterium leprae*, ursprünglich als *Bacillus leprae* bezeichnet, zum Genus *Mycobacterium* zusammenzufassen und sie der Familie Mycobacteriaceae unterzuordnen. Somit zählen Mykobakterien zu der Ordnung Actinomycetales und der Klasse Actinomycetes.

Taxonomische Klassifikation:

Stamm Actinobacteria

Klasse Actinobacteria

Unterklasse Actinobacteridae

Ordnung Actinomycetales

Unterordnung Corynebacterineae

Familie Mycobacteriaceae

Genus *Mycobacterium*

(LEHMANN & NEUMANN, 1896)

Diese Einteilung beruhte zunächst auf morphologischen Kriterien. Um sie besser von den nah verwandten Genera *Nocardia*, *Rhodococcus* und *Corynebacterium* abzutrennen, wurden noch weitere Kriterien zur Unterscheidung hinzugefügt. Dazu gehörten Gramfärbung, Wachstumsgeschwindigkeit, Resistenz gegenüber Penicillin, der Guanin/Cytosin-Gehalt, Mykolsäureprofile und Produktion von Arylsulfatase. (SHINNICK & GOOD, 1994). Aktuell müssen folgende Kriterien erfüllt sein, um eine Spezies dem Genus *Mycobacterium* zuzuordnen:

- 1) Alkohol- und Säurefestigkeit
- 2) Das Vorhandensein einer aus 60 - 90 Kohlenstoffatomen bestehenden Mykolsäure, die durch Pyrolyse in Fettsäuremethylester mit 22 - 26 Kohlenstoffatomen gespalten werden kann
- 3) Ein 61 - 71 prozentiger Guanin/Cytosin-Gehalt in der DNA

(LÉVY-FRÉBAULT & PORTAELS, 1992)

Die Spezies des Genus *Mycobacterium* können als Saprophyten, opportunistische und auch obligat pathogene Vertreter auftreten. Sie werden in die Erreger der Tuberkulose beim Säugetier, Mitglieder des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes, welche zu den obligat pathogenen und langsam wachsenden Erregern gehören, die obligat humanpathogene Spezies *M. leprae*, und in die davon abzugrenzenden nicht tuberkulösen Mykobakterien (NTM) eingeteilt. Als Synonym für NTM wird auch der Begriff „Mycobacteria other than Tubercle Bacilli“ (MOTT) verwendet (NEUMEISTER et al., 1992). Unter diese Gruppe fallen auch die Mitglieder des *Mycobacterium-avium*-Komplexes (MAC), *M. intracellulare* und schnell wachsende, atypische Mykobakterien, Saprophyten, die nur unter bestimmten Bedingungen als opportunistische Infektionserreger auftreten. Zur Speziesdiagnose werden biochemische Tests und verschiedene kulturelle Merkmale herangezogen.

Mykobakterien lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen:

- Schnell wachsende Mykobakterien mit sichtbarem Koloniewachstum in weniger als sieben Tagen
- Langsam wachsende, obligat pathogene Mykobakterien mit sichtbarem Koloniewachstum in mehr als sieben Tagen

(SELBITZ et al., 2015)

Eine weitere Einteilung der MOTT erfolgt auf Basis ihrer Pigmentbildung und Wachstumsgeschwindigkeit in die Runyon Gruppen I bis IV (RUNYON, 1959):

- Gruppe I: langsam wachsende photochrome Spezies
- Gruppe II: langsam wachsende skotochrome Spezies
- Gruppe III: langsam wachsende pigmentfreie Spezies
- Gruppe IV: schnell wachsende Spezies

(STAHL & URBANCE, 1990)

1.2 Morphologie und mikrobiologische Eigenschaften

Mykobakterien sind gerade oder leicht gebogene, unbewegliche, sporenlose Stäbchen mit einer Größe von 0,2 - 0,7 x 1,0 - 10,0 µm (SELBITZ et al., 2015) und wachsen am besten unter aeroben oder mikroaerophilen Bedingungen (STAHL & URBANCE, 1990). Mykobakterien (abgeleitet vom griechischen Wort für Pilz, „múkēs“/“myces“) sind in der Lage, verzweigte Filamente zu bilden. Dies zeigt sich im kulturellen Wachstum, bei dem die Kolonien pilzähnliches Wachstum zeigen. Sie zeichnen sich durch einen besonderen Zellwandaufbau aus (siehe Abbildung 1). Mykobakterien gehören zu einer größeren Gruppe der gram-positiven Bakterien mit einer GC-reichen DNA, die auch als Actinomyceten-Linie bezeichnet wird. Diese Bakterien besitzen Zellwände mit einer einzigartigen Struktur, sogenannte Chemotyp-IV-Zellwände (BRENNAN & NIKAIDO, 1995). Der mykobakteriellen Plasmamembran ist eine mehrschichtige Peptidoglykanschicht ohne äußere Membran aufgelagert, was somit im Prinzip dem Zellwandaufbau eines gram-positiven Bakteriums entspricht. Auf die Peptidoglykanschicht folgt, kovalent gebunden, ein wichtiges Merkmal der Chemotyp-IV-Zellwand, nämlich ein einzigartiges Polysaccharid, das sogenannten Arabinogalaktan (AG), das durch charakteristische langkettige Fettsäuren, die sogenannten Mykolsäuren, ergänzt wird (BRENNAN & NIKAIDO, 1995). Sie sind aus β-Hydroxy-Fettsäuren und langen α-Alkyl-Seitenketten aufgebaut (ASSELINÉAU & LEDERER, 1950). Diese Mykolsäuren enthalten bei Mykobakterien klassischerweise 70 - 90 Kohlenstoffatome, während die Mykolsäuren bei *Corynebacterium* und *Nocardia* nur 40 - 60 Kohlenstoffatome enthalten (BRENNAN & NIKAIDO, 1995). Die äußerste Schicht bilden einige lang- und kurzkettige Fettsäuren. Dazwischen finden sich unter anderem Lipide wie Lipoarabinomannan (LAM) und Trehalose-basierende Lipooligosaccharide (LOSs), zu denen auch der Cord-Faktor (Trehalose 6,6'-Dimycolat; TDM) gehört, das Phosphatidylinositolmannosid (PIM), Phthiocerole und Lipomannan (LM). Diese sind nicht kovalent an den Arabinogalactan-Peptidoglykan-Komplex gebunden. Einige dieser Zellwandbestandteile sind wichtige Pathogenitätsfaktoren (siehe Abschnitt 2.2.3) (BRENNAN & NIKAIDO, 1995). Durch diesen besonderen Zellwandaufbau besitzen Mykobakterien die Eigenschaft der Säurefestigkeit. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass Farbstoff zwar durch die Einwirkung von Hitze und Phenol in die Bakterien eindringen, aber nicht durch Behandlung mit Säure und Alkohol wieder ausgewaschen werden kann, was im

Wesentlichen von den Mykolsäuren abhängt (BERG, 1953). Deswegen können Mykobakterien mit der Ziehl-Neelsen-Färbung nachgewiesen werden (SELBITZ et al., 2015). Aufgrund der wachsartigen Struktur und der damit verbundenen schwachen Permeabilität der dicken Zellwand sind Mykobakterien besonders resistent gegen die meisten Antibiotika und chemotherapeutischen Substanzen, aber auch gegenüber Umwelteinflüssen, wie Austrocknung und verschiedene Desinfektionsmittel (LIU et al., 1996; GONZALEZ-Y-MERCHAND et al., 1997).

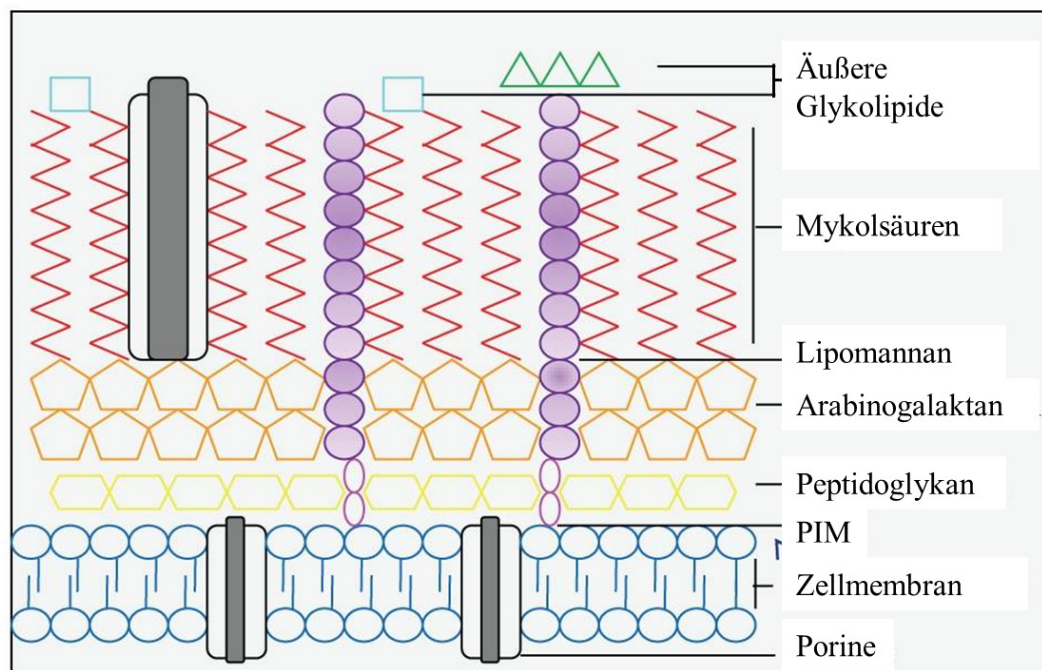


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus der Mykobakterien

Modifiziert nach Kleinnijenhuis et al. (KLEINNIJENHUIS et al., 2011)

Ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die intrazelluläre Persistenz der Mykobakterien in Makrophagen. Dabei spielen vor allem die Glykolipide der Zellwand und der Cord-Faktor eine wichtige Rolle, da sie die Ansäuerung und Reifung der Phagosomen zum Phagolysosom verhindern (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994). Folglich werden die Bakterien nach der Phagozytose durch Makrophagen nicht eliminiert und können so in den Phagosomen der Zellen persistieren (CLEMENS & HORWITZ, 1995). Es wird damit nicht nur die Aktivierung der Makrophagen unterlaufen, sondern es kommt zusätzlich zu einer unzureichenden oder gar fehlenden T-Zell-Stimulierung, da die befallenen

Makrophagen dazu angeregt werden, immunsuppressive Zytokine zu produzieren. Dies kann dann zu einer Begünstigung der Erregerausbreitung im Wirt führen (FLYNN & CHAN, 2001). Eine genauere Beschreibung der Pathogenitätsfaktoren ist im Kapitel 2.2 zu finden.

Mykobakterien können in flüssigen, sowie auf festen Nährböden kultiviert werden. Klassisch verwendete Nährmedien sind jene nach Löwenstein-Jensen, Middlebrook, Hohn oder Herrold's-EggYolk. Die Kultivierung erfolgt bei 37 °C unter aeroben Bedingungen auf eigelbhaltigen Nährböden im Schrägagarröhrchen, auf der Platte oder in Flüssigkultur. Hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens lassen sich schnell wachsende (weniger als sieben Tage) von langsam wachsenden Mykobakterien (mehr als sieben Tage) unterscheiden, wobei die meisten pathogenen Mykobakterien ein extrem langsames Wachstum zeigen, bei dem es bis zu zwölf Wochen dauern kann bis ein sichtbares Koloniewachstum auf einem Festnährboden entsteht und sichtbar wird (SELBITZ et al., 2015). Eine Ausnahme hierfür bildet *Mycobacterium leprae*, da es bisher gar nicht kultivierbar ist (DAHW, 2016).



Abbildung 2: Kulturelles Wachstum von *M. bovis* BCG auf dem Schrägagar
Gelbliche *M. bovis* BCG Kolonien auf Löwenstein-Jensen Agar mit Glycerin und PACT 510r Schrägschichtmedium (Merck Chemicals GmbH) nach sechswöchiger Inkubation

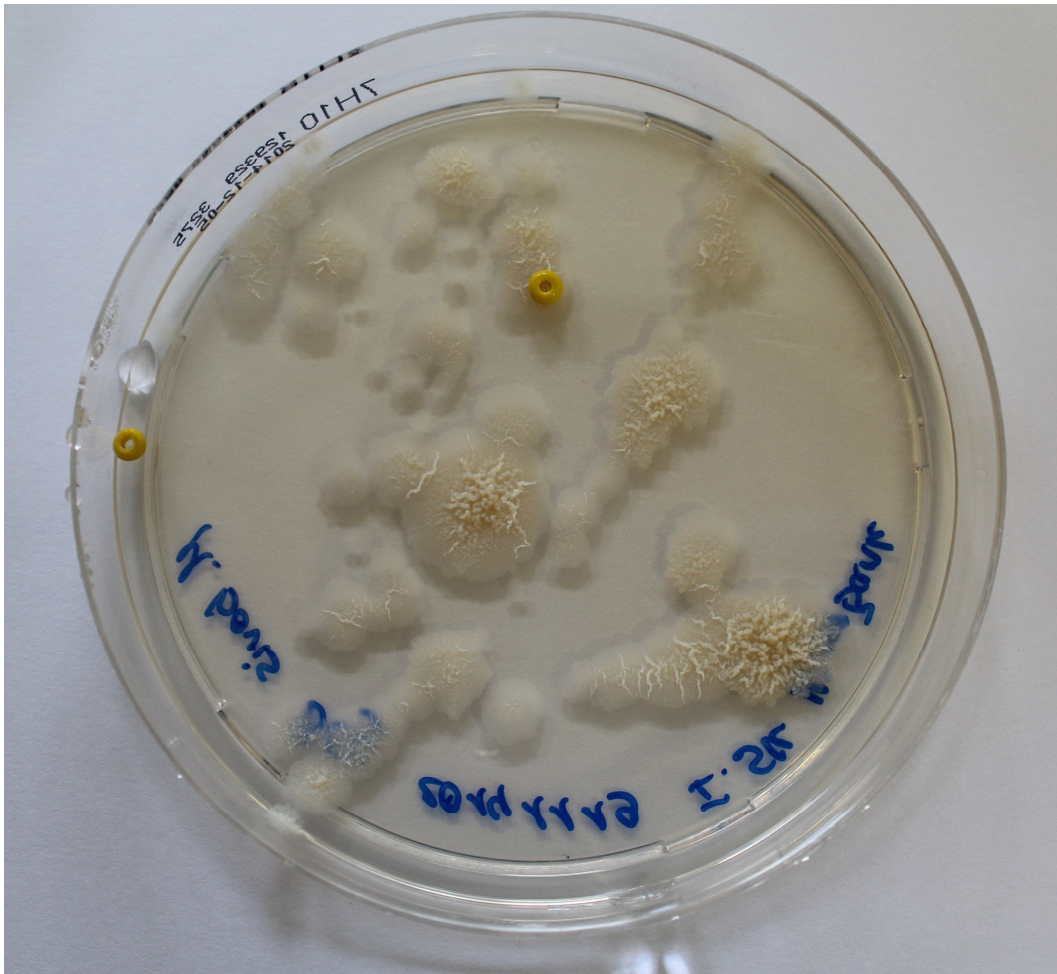


Abbildung 3: Kulturelles, pilzähnliches Wachstum von *M. bovis* BCG

M. bovis BCG Reinkultur auf Middlebrook 7H10 Agar mit OADC (Merck Chemicals GmbH) nach achtwöchiger Inkubation

Das pilzartige, verzweigte Wachstum der Mykobakterien ist gut zu erkennen.

2 Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC)

Unter dem Begriff „*Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex“ versteht man die für Mensch und Säugetier relevanten Erreger der Tuberkulose. Die Mykobakterien, die unter diesem Komplex zusammengefasst werden, stimmen zu 99,9 % ihres Genoms überein und besitzen eine nahezu identische 16S rRNA Sequenz (BÖDDINGHAUS et al., 1990; SREEVATSAN et al., 1997; GARNIER et al., 2003; HUARD et al., 2006). Es gibt nur selten Hinweise für Rekombinationsergebnisse und horizontalen Gentransfer innerhalb der Mitglieder des Komplexes (SMITH et al., 2006). Die MTC-Mitglieder unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wirtstropismus, ihres Phänotypes und ihrer Pathogenität (BROSCH et al., 2002)

und können trotz ihrer engen genetischen Verwandtschaft aufgrund von molekularen Markern (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014) und ihren unterschiedlichen kulturellen und biochemischen Eigenschaften voneinander abgegrenzt werden (COLLINS & DE LISLE, 1985). Diese Unterschiede hinsichtlich Wirtstropismus, Phänotyp und Pathogenität beruhen vermutlich auf einzelnen Punktmutationen (KARLSON & LESSEL, 1970) und auf einer unterschiedliche Genexpression, die nur 6 % des Gesamtgenoms betrifft (REHREN et al., 2007). Gemäß des relativ niedrigen Genpolymorphismus (GARNIER et al., 2003) wären die Mitglieder des MTC aus taxonomischer Sicht eher als verschiedene Subspezies anstelle von eigenständigen Spezies einzustufen (ROGALL et al., 1990).

2.1 Mitglieder des MTC

Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex bestand ursprünglich aus fünf Mitgliedern: *M. tuberculosis*, welches vor allem bei Menschen und anderen Primaten isoliert wurde; *M. bovis*, der vorrangig Tuberkulose bei Rindern verursacht, aber auch Tuberkulose bei vielen anderen Tieren und dem Menschen hervorrufen kann; *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG), ein attenuierter *M.-bovis*-Stamm, der für Impfungen verwendet wird; *M. africanum*, der aus einer heterogenen Gruppe von Isolaten besteht, vorrangig Tuberkulose bei Menschen in Afrika verursacht und genetisch zwischen *M. tuberculosis* und *M. bovis* einzuordnen ist und *M. microti*, ein selten isolierter Erreger, der Tuberkulose bei Wühlmäusen, aber auch bei immunsupprimierten Menschen hervorrufen kann (COUSINS et al., 2003).

Zum jetzigen Zeitpunkt zählen folgende Spezies zum MTC:

- *M. tuberculosis* (KOCH, 1882),
- *M. bovis* (KARLSON & LESSEL, 1970),
- *M. bovis* BCG (GUÉRIN & ROSENTHAL, 1957),
- *M. canettii* (VAN SOOLINGEN et al., 1997),
- *M. africanum* (CASTETS et al., 1968; CASTETS et al., 1969),
- *M. microti* (WELLS, 1937; REED, 1957),
- *M. pinnipedii* (COUSINS et al., 2003),
- *M. caprae* (ARANAZ et al., 2003),
- *Dassie bacillus* (WAGNER et al., 1958; PARSONS et al., 2008).

Van Ingen et al. schlugen 2012 nach molekularbiologischer Charakterisierung von 22 *Oryx-bacillus*-Isolaten vor, den *Oryx bacillus* in *Mycobacterium orygis* umzubenennen und als Subspezies in den MTC aufzunehmen, da dieser vor allem in Afrika und im Süden Asiens ein Auslöser der Tuberkulose bei Menschen und Tieren ist (VAN INGEN et al., 2012). Alexander et al. isolierten zudem im Jahr 2010 einen dem *Dassie bacillus* sehr ähnlichen Erreger, *Mycobacterium mungi*, der Tuberkulose bei Mangusten in Botswana auslösen kann. Dieser wurde dann ebenfalls als neue Spezies in den MTC aufgenommen (ALEXANDER et al., 2010).

M. tuberculosis, der Erreger der humanen Tuberkulose, ist laut der World Health Organization der bedeutendste Tuberkuloseerreger beim Menschen (WHO, 2015). Allerdings können selten auch Haussäugetiere nach längerem Kontakt mit infizierten Menschen infiziert werden (MICHEL et al., 2003). Zu den bekannten infizierten Tieren gehören unter anderem Rinder (*Bos taurus*) (ROMERO et al., 2011), Ziegen (*Capra aegagrus hircus*) (HIKO & AGGA, 2011), Schweine (*Sus scrofa* und *Sus scrofa domesticus*) (JENKINS et al., 2011), Hunde (*Canis lupus familiaris*) (PARSONS et al., 2012) und auch Vögel, wie beispielsweise Graupapageien (*Psittacus erithacus erithacus*) (SCHMIDT et al., 2008). Aber auch aus Wild- und Zootieren konnte der Erreger bereits isoliert werden (MICHEL et al., 2003; UNE & MORI, 2007; ANGKAWANISH et al., 2010).

M. bovis Bacille Calmette Guérin (BCG) ist Bestandteil des einzig zugelassenen Impfstoffes gegen Tuberkulose seit 1929. Somit gehört er zu einem der ältesten, aber auch umstrittensten Impfstoffe, die am häufigsten auf globaler Ebene zur Impfung gegen Tuberkulose verwendet werden. Es hat über 13 Jahre Forschung und etwa 230 Passagen gedauert, bevor er in Meerschweinchen (*Cavia porcellus*), Rindern, Pferden (*Equus caballus*), Hamstern (Familie der *Cricetinae*), Mäusen (*Mus musculus*) und Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) eine schützende Immunität bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* hervorbringen konnte (GUÉRIN & ROSENTHAL, 1957). Der attenuierte Stamm wurde über Jahrzehnte durch kontinuierliche Kulturpassagen aufrechterhalten. Dabei kam es durch kleine, meist stumme Mutationen zu einem genetischen Polymorphismus und somit zu einer Vielzahl von unterschiedlichen *M.-bovis*-BCG-Stämmen (BEHR & SMALL, 1999; GARCIA PELAYO et al., 2009).

2.2 Virulenz

Da das Spektrum bekannter Pathogenitätsfaktoren sehr groß ist (FORRELLAD et al., 2013), werden im Folgenden nur einige Wichtige beschrieben.

2.2.1 Aufnahme in die Zielzellen

Makrophagen dienen als natürlicher Lebensraum für Mykobakterien und sind Zielzellen für den intrazellulären Parasitismus. Die Aufnahme in die Zielzellen kann entweder unspezifisch über Pinozytose oder spezifisch über Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen erfolgen (HMAMA et al., 2015). Zu diesen Rezeptoren gehören unter anderem Komplement-Rezeptoren (CR1, CR3 und CR4), der Fc γ -, der CD14-, der Fibronektin-, der Mannose- und die Sp-A-Rezeptoren (ERNST, 1998; TOOSSI & ELLNER, 1998).

Nach Opsonisierung der Bakterien durch Komplementfaktoren C3b und C3bi können diese über die oben genannten Komplement-Rezeptoren in die Makrophagen über Phagozytose aufgenommen werden (SCHLESINGER et al., 1990). Ähnlich verhält es sich mit mit IgG-Antikörper-markierten Bakterien, die über den Fc γ -Rezeptor vermittelt aufgenommen werden können (ARMSTRONG & HART, 1975).

Lipoarabinomannan gilt als essentieller Bestandteil der mykobakteriellen Zellwand und ist Ligand sowohl für den CD14-Rezeptor (PUGIN et al., 1994), als auch für den Mannose-Rezeptor (SCHLESINGER et al., 1994; SCHLESINGER et al., 1996). Beide Rezeptoren ermöglichen die Aufnahme von Mykobakterien in die Zielzelle.

2.2.2 Überleben in Makrophagen

Nach Aufnahme der Mykobakterien in die Makrophagen persistieren die Bakterien in den Phagosomen und sind in der Lage, die Zielzellfunktionen aktiv zu beeinflussen (SAKAMOTO, 2012). Unter normalen Umständen fusioniert innerhalb des Makrophagen das Phagosom mit dem Lysosom zum Phagolysosom und sein Inhalt, inklusive intrazellulärer Pathogene, wird durch lysosomale Hydrolasen und reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffverbindungen (RNS) zerstört (FORRELLAD et al., 2013). MTC-Mitglieder haben jedoch Mechanismen entwickelt, um der sauren Umgebung innerhalb des Phagolysosomes zu entkommen (MCDONOUGH et al., 1993) und auch die Phagosomenreifung und somit die Fusion des Phagosoms mit dem Lysosom zu hemmen (VIA et al., 1997).

Um sich vor ROS, wie beispielsweise Superoxidanionen (O_2^-) schützen zu können, besitzen Mykobakterien zwei unterschiedliche Vertreter einer Superoxiddismutase (SodA und SodC), die die Superoxidanionen zu für sie ungefährlichem molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid abbauen können (PIDDINGTON et al., 2001). Zusätzlich ist auch LAM in der Lage, toxische Sauerstoffradikale zu binden. Es nimmt außerdem eine zentrale Rolle bei der Hemmung von Effektor-Funktionen der Makrophagen ein, indem es die Transkription der durch IFN- γ regulierten Gene einschränkt und die Proteinase-C hemmt, welche eine wichtige Rolle in der Signalübertragung zur Makrophagen-Aktivierung spielt (CHAN et al., 1991).

Neben der Erhöhung des Widerstandes gegenüber toxischen Verbindungen des Wirtes und Hemmung der Phagolysosomenreifung gibt es noch eine dritte Möglichkeit zum Überleben im Makrophagen, nämlich die Vermeidung des Einleitens der Apoptose zugunsten eines nekrotischen Zellunterganges (FORRELLAD et al., 2013). *M. tuberculosis* kann die Makrophagen-Oberfläche dahingehend modifizieren, dass die Zelle nicht durch Apoptose, sondern durch Nekrose zugrunde geht (GAN et al., 2008; DIVANGAHI et al., 2009). Die Einleitung der Nekrose wird bei einer hohen intrazellulären Dichte von virulenten Bakterien aktiv ausgelöst, damit die Bakterien freigesetzt werden und andere Zellen infizieren können (LEE et al., 2009).

Es ist jedoch ebenso bekannt, dass *M. tuberculosis* die Apoptose bei Infektion der Wirtszelle induzieren kann (DERRICK & MORRIS, 2007). Das Ausmaß der Apoptose ist daher abhängig vom infizierenden MTC-Stamm.

2.2.3 Zellwandbestandteile als Pathogenitätsfaktoren

Die Mykolsäuren der Mykobakterien spielen im Hinblick auf die Tenazität des Erregers eine übergeordnete Rolle, da sie die Zelle vor Austrocknung (BARRY & MDLULI, 1996) und vor chemischen Einflüssen in Form von hydrophoben Antibiotika schützen (NIKAIDO, 1994).

Das immunogene Glykolipid LAM, wurde bereits bei den oben genannten Punkten als Ligand für Oberflächenrezeptoren und in seiner Funktion bei der Beeinflussung der Makrophagen-Aktivität beschrieben. Ähnliche Stoffe zu LAM sind Phosphatidylinositolmannosid, Lipomannan, und Phosphatidylinositol (PI). Das Acylphosphatidylinositolhexamannosid (AcPIM₆) nimmt eine besondere

Stellung in der Pathogenese ein, da es zu einer vermehrten Proliferation von insbesondere natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und zu erhöhten IFN- γ -Konzentrationen in mononukleären Blutzellen führt (PIRSON et al., 2015).

Phthioceroldimyocerosate (DIM), aus der Gruppe der Zellwandlipide, haben ihre Rolle im Virulenzgeschehen vor allem in frühen Infektionsstadien bei der Rezeptor-vermittelten Aufnahme in die Makrophagen. Durch eine Reorganisation der Plasmamembran der Wirtszelle werden einerseits ihre biophysikalischen Eigenschaften modifiziert und andererseits auch das innere Milieu der Makrophage beeinflusst und die phagosomale Ansäuerung gehemmt. DIMs werden von allen MTC-Mitgliedern gebildet (ASTARIE-DEQUEKER et al., 2009).

Andere Zellwandlipide, die Sulfolipide (SL), konnten in vitro bei Makrophagen die Fusion von Phagosom mit Lysosom verhindern (GOREN et al., 1976).

Der Cord-Faktor oder Trehalose 6,6'-Dimykolat (TDM) ist ein gut erforschter Virulenzfaktor von Mykobakterien und scheint einer der potentesten Immunmodulatoren zu sein (YANO, 1998). Auch TDM ist in der Lage, die Bildung des Phagolysosoms zu blockieren und das Ansäuern desselben zu verhindern (INDRIGO et al., 2003). Außerdem ermöglicht es das sogenannte „cording“ von mehreren Mykobakterien, also ihre schnurartige Zusammenlagerung und die Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen (MMP), die beim Abbau der granulomatösen Bindegewebskapsel beteiligt sind, um ein Entkommen der Bakterien aus dem Granulom zu ermöglichen (SAKAMOTO et al., 2013). Hunter et al. konnten jedoch zusätzlich nach experimentellen Studien zeigen, dass TDM die Entwicklung von Granulomen zunächst fördert, um so anfänglich das langfristige Überleben und die Persistenz der Mykobakterien innerhalb des Wirtes zu sichern (HUNTER et al., 2006).

2.3 Tenazität

Obwohl Mykobakterien normalerweise intrazellulär in Makrophagen persistieren, besitzen sie durch ihren besonderen Zellwandaufbau eine hohe Tenazität gegenüber Umweltfaktoren (GONZALEZ-Y-MERCHAND et al., 1997). Fine et al. unternahmen eine Studie mit experimentell mit *M. bovis* beimpften Proben unterschiedlicher Art, die sie über einen Zeitraum von einem Jahr und unter natürlichen Wetterbedingungen aufbewahrten und in regelmäßigen Abständen auf

die Überlebensfähigkeit durch Kultivierung von *M. bovis* untersuchten. Dabei konnten vermehrungsfähige Erreger bis zu 43 Tage in Getreide, 58 Tage in Heu und Wasser und sogar 88 Tage in Erde isoliert werden. Des Weiteren fanden sie heraus, dass Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen und intensive Sonneneinstrahlung, wie sie im Frühling und im Sommer auftreten, zu Feuchtigkeitsverlusten führen, was die Überlebensfähigkeit des Erregers deutlich verringert (FINE et al., 2011). Auch in Umweltproben, die durch Exkrete von mit *M.-bovis*-infizierten Dachsen und Rindern kontaminiert waren, konnte *M. bovis* noch vier und 21 Monate lang nach möglicher Kontamination nachgewiesen werden (YOUNG et al., 2005). Nicht nur für *M. bovis*, sondern auch für andere MTC-Mitglieder, wie *M. tuberculosis* und *M. canettii*, konnte ein Überleben über zwölf Monate in der Erde und der Erhalt der Fähigkeit zur Infektion von Mäusen nachgewiesen werden (GHODBANE et al., 2014). Von besonderer Bedeutung ist die Tenazität von Mykobakterien in Rohmilch und Rohmilch-Produkten aufgrund ihres zoonotischen Potenzials. So können die Erreger in Joghurt bis zu 14 Tage und in Weichkäse bis zu 100 Tage infektiös bleiben (TRAUTWEIN, 2006). Durch die Pasteurisierung können Mykobakterien jedoch innerhalb von Sekunden bis wenige Minuten abgetötet werden, sodass die Milch vom Menschen ohne Risiko verzehrt werden kann (HARRINGTON & KARLSON, 1965).

Außerdem sind Mykobakterien trotz ihrer Säurefestigkeit wenig tolerant gegenüber niedrigen pH-Werten und verlieren nach Exposition nach kurzer Zeit ihre Überlebensfähigkeit (NEUMEISTER et al., 1992).

2.4 Besonderheiten des Genoms von MTC-Mitgliedern

Eine der Besonderheiten des mykobakteriellen Genoms stellen die sogenannten „Regions of difference“ (RDs) dar. Diese variablen Regionen sind Sequenzen mit einer Länge von 2 - 12,7 kb und konnten durch Sequenzanalysen und -vergleiche von *M. bovis* BCG und dem Referenzstamm *M. tuberculosis* H37Rv erstmals beschrieben werden (GORDON et al., 1999). Man kann sich diese RDs zur Differenzierung der verschiedenen MTC-Mitglieder zu Nutzen machen, da ihr Genom unterschiedlich deletiert ist. Insgesamt konnten 14 RDs identifiziert werden, durch die eine Spezies-Differenzierung möglich ist. Dies gelang durch verschiedene Hybridisierungstechniken und PCR-Ansätze von 100 klinischen MTC-Isolaten (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Differenzierung der einzelnen MTC-Spezies ist die Untersuchung der Polymorphismen auf Einzelnukleotidebene (single nucleotide polymorphism, SNP). Diese Untersuchung eignet sich gut zur Differenzierung der MTC-Mitglieder, da ein SNP, wenn er sich einmal in einer klonalen Linie etabliert hat, dort relativ stabil erhalten bleibt (HUARD et al., 2006). Zusätzlich wurden häufig identifizierte SNPs in bestimmten Genen alleine oder in Kombination als spezifischer Marker für eine bestimmte MTC-Spezies eingesetzt, oder auch um Isolate in einen definierten phylogenetischen Stammbaum einzuordnen (COLE, 2002; MOSTOWY et al., 2002; HUARD et al., 2003). Rodriguez-Campos et al. haben aufgrund von RD-Deletionen und SNPs einen aktualisierten phylogenetischen Stammbaum für die Mitglieder des MTC erstellt (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014):

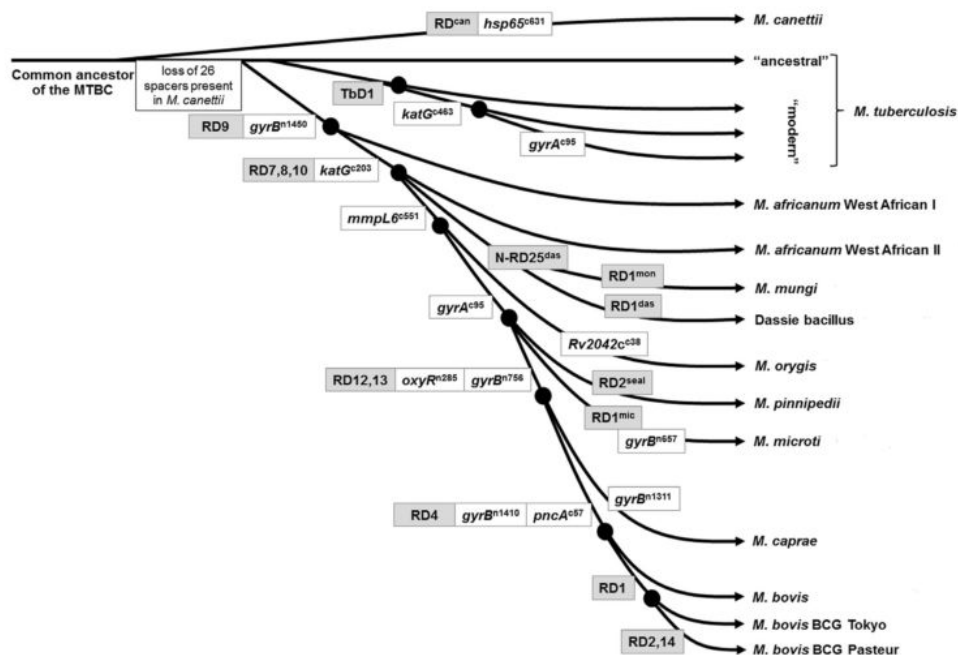


Abbildung 4: Aktualisierter phylogenetischer Stammbaum des MTC

Modifiziert nach Rodrigues-Campos (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014)

Die Differenzierung der einzelnen MTC-Spezies beruht auf An- und Abwesenheit von RDs und SNPs in deren Genom

Noch vor nicht allzu langer Zeit gab es die Hypothese, dass *M. tuberculosis* von *M. bovis* abstammt. Dabei soll *M. bovis* vor ca. 10000 - 150000 Jahren im Zuge der Domestikation von Rindern auf den Menschen übertragen worden sein und

sich an ihn durch genetische Veränderungen adaptiert haben. Durch diesen Vorgang soll die Spezies *M. tuberculosis* entstanden sein (STEAD et al., 1995). Nach Beginn der phylogenetischen Untersuchungen konnte diese Hypothese allerdings widerlegt werden, da das Genom von *M. bovis* die meisten RD-Deletionen aufweist (RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13). Dies legt nahe, dass *M. bovis* der jüngste pathogene Vertreter des MTC ist (BROSCH et al., 2002; GARNIER et al., 2003; TAYLOR et al., 2007a).

Im Gegensatz dazu beinhalten die Genome von *M. canettii* und *M. tuberculosis* alle RD-Sequenzen, was zu der Annahme führt, dass sich alle weiteren Mitglieder des MTC aus ihnen entwickelt haben (BROSCH et al., 2002).

3 Die Erreger der Rindertuberkulose

Gemäß der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (RINDTB-VO, 2014) ist Rindertuberkulose definiert als eine nachgewiesene Infektion von Boviden mit *M. bovis* oder *M. caprae*.

3.1.1 *Mycobacterium bovis*

Die Hauptwirte für *M. bovis* stammen aus der Familie der Bovidae. Dabei stellen im Allgemeinen Hausrinder die am stärksten empfängliche Art dar, jedoch werden mögliche Unterschiede in der Anfälligkeit zwischen verschiedenen Unterarten (*Bos taurus* und *Bos indicus*) in der Literatur diskutiert (AMENI et al., 2007; SMITH et al., 2011). Allerdings weist *M. bovis* im Allgemeinen ein großes Wirtsspektrum auf (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014). Unter anderem konnte der Erreger beim Menschen (COSIVI et al., 1998; JENKINS et al., 2011; THOEN et al., 2016), Rind (*Bos taurus*) (KARLSON & LESSEL, 1970; THAKUR et al., 2012), Rehwild (*Capreolus capreolus*) (ZANELLA et al., 2008), Rotwild (*Cervus elaphus*) (DE LISLE & HAVILL, 1985), Dammwild (*Dama dama*) (GARCÍA-JIMÉNEZ et al., 2012), Haus- (*Sus scrofa domesticus*) und Wildschwein (*Sus scrofa*) (PARRA et al., 2003), Pferd (*Equus caballus*) (MONREAL et al., 2001; KECK et al., 2010), Hund (*Canis lupus familiaris*), Katze (*Felis catus*) und auch dem Fuchs (*Vulpus vulpus*) (RODRÍGUEZ et al., 2011) nachgewiesen werden. Der Dachs (*Meles meles*) in Großbritannien (DELAHAY et al., 2001), das Wildschwein in Spanien (NARANJO et al., 2008) und der Fuchskusu

(*Trichosorus vulpecula*) in Neuseeland (NUGENT et al., 2015) gelten offiziell als Wildtierreservoir für *M. bovis* und als Infektionsquelle für Rinder.

Im Jahr 2003 wurde durch Garnier et al. das Gesamtgenom von *M. bovis* AF2122/97 vervollständigt und mit dem *M.-tuberculosis*-Stamm H37Rv verglichen (GARNIER et al., 2003). Dabei fiel auf, dass die Genomsequenz von *M. bovis* zwar zu über 99,95 % mit der vom *M.-tuberculosis*-H37Rv-Stamm übereinstimmt, sie aber deutlich kleiner ist (4.345.492 bp zu 4.411.529 bp) (COLE et al., 1998; GARNIER et al., 2003). Es wurden insgesamt weniger potentiell proteincodierende Gene und mehr als 2.420 SNPs gefunden und es wurden keine zusätzlichen speziellen Gene im Genom von *M. bovis* identifiziert (GARNIER et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass *M. bovis* sich aus einem *M.-tuberculosis*-ähnlichen Organismus entwickelt hat (SMITH et al., 2009). Rindertuberkulose ist weltweit bei Rindern zu finden und wurde vermutlich durch Handel mit domestizierten Rindern in andere Länder eingeführt und verbreitet (SMITH, 2012).

3.1.2 *Mycobacterium caprae*

Nachdem *M. caprae* im Jahr 1999 in Spanien erstmals bei Ziegen durch Aranaz et al. nachgewiesen werden konnte, wurde der Erreger aufgrund von biochemischen und gentechnischen Untersuchungen zunächst als *M. tuberculosis* subsp. *caprae* eingestuft (ARANAZ et al., 1999). Nach weiterführenden Untersuchungen im Jahr 2002 wurde er aufgrund der großen genetischen Ähnlichkeit als Subspezies von *M. bovis* diskutiert (NIEMANN et al., 2002). Da in vergleichenden Genomanalysen jedoch SNPs in einigen Genen und das Vorkommen und Fehlen von definierten Sequenzabschnitten (RDs) aufzufinden waren, wird vermutet, dass *M. caprae* phylogenetisch älter als *M. bovis* ist (BROSCH et al., 2002; MOSTOWY et al., 2002). Daher wurde *M. bovis* subsp. *caprae* schließlich als *Mycobacterium caprae* als neue Spezies der Gattung *Mycobacterium* zugefügt (ARANAZ et al., 2003).

M.-caprae-Stämme werden vorwiegend in Spanien und zentral- und westeuropäischen Ländern isoliert (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014). Auch im Süden Deutschlands kommen Fälle von Rindertuberkulose bei Rotwild und Rindern im Zusammenhang mit *M. caprae* vor (DOMOGALLA et al., 2013; MOSER et al., 2014; FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015; MENGE et al.,

2016). Das Wirtsspektrum des Erregers ist, ebenso wie das von *M. bovis*, weit. Es sind bereits Fälle beim Menschen (RODRÍGUEZ et al., 2009; PRODINGER et al., 2014; NEBREDÁ et al., 2016), bei Ziegen, Rindern, Schafen und Rotwild (PRODINGER et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2011; FINK et al., 2015), Haus- und Wildschweinen (RODRÍGUEZ et al., 2011) und auch bei Zootieren wie dem sibirischen Tiger (*Panthera tigris altaica*) (LANTOS et al., 2003), Kamelen (*Camelus ferus*) (ERLER et al., 2004), Dromedaren (*Camelus dromedarius*) und Bisons (*Bison bison*) (PATE et al., 2006) bekannt. Dabei wurden identische Genotypen in Rind und Wildschwein (ERLER et al., 2004), in Rind und Hausschwein (PAVLIK et al., 2002) und innerhalb des Zoos in Kamel und Bison (PATE et al., 2006) identifiziert, was auf eine Übertragung zwischen den verschiedenen Spezies schließen lässt.

Domogalla et al. untersuchten im Jahr 2013 die RD4 Region von *M. caprae* genauer und stellten dabei fest, dass in den *M.-caprae*-Isolaten aus dem süddeutschen Alpenraum mindestens vier RD4-Varianten vorkommen. Daher stellt die RD4 eine eher heterogene Region im Genom von *M. caprae* dar. Dies macht die bisherige Abgrenzung zu *M. bovis* auf Basis von RD4-spezifischen PCRs schwer, da die RD4 bei *M. bovis* deletiert ist und bei *M. caprae* ein unterschiedliches Deletionsmuster aufweist. Allerdings kann diese Heterogenität zur Einteilung von *M.-caprae*-Isolaten in verschiedene Genotypen und ihre geographische Verteilung genutzt werden (DOMOGALLA et al., 2013) und diese Daten für epidemiologische Studien verwendet werden (RETTINGER et al., 2015). Noch aktuellere Studien befassen sich mit der erstmaligen Beschreibung des Gesamtgenoms von *M.-caprae*-Isolaten aus Rindern aus dem bayrischen Alpenraum und der genaueren Untersuchung der RD4-Region aufbauend auf den Studien von Domogalla et al. (DOMOGALLA et al., 2013), und sind erst vor Kurzem veröffentlicht (BROECKL et al., 2017). Die erste Gesamtgenomsequenz von *M. caprae* aus einem spanischen Feldisolat wurde erst vor kurzem von De la Fuente et al. veröffentlicht (DE LA FUENTE et al., 2015).

3.1.3 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von *M. bovis* und *M. caprae*

Im Hinblick auf die RD-Sequenzen sind *M. caprae* und *M. bovis* die Deletionen RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12 und RD13 gemein (ARANAZ et al., 2003). Die einzige unterschiedliche RD-Sequenz ist die RD4, eine 12,7-kb-lange Sequenz, die dem Genom von *M. bovis* fehlt und bei *M. caprae* konserviert, aber in unterschiedlichen Variationen vorhanden ist (ARANAZ et al., 2003; SOMOSKOVI et al., 2008; DOMOGALLA et al., 2013). Auch auf SNP-Ebene gibt es Merkmale, anhand derer eine Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* und eine Differenzierung zu anderen Mitgliedern des MTC möglich ist (SCORPIO & ZHANG, 1996; BROSCHE et al., 2002; NIEMANN et al., 2002; ARANAZ et al., 2003; REDDINGTON et al., 2011). Eine Übersicht über die SNPs zur Speziesdifferenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: SNPs zur Speziesdifferenzierung von *M. caprae* und *M. bovis*

Gen	Position	SNP	<i>M. bovis</i>	<i>M. caprae</i>	andere MTC-Spezies	spezifisch für
<i>pncA</i>	169	C zu G	+	-	-	<i>M. bovis</i>
<i>oxyR</i>	285	G zu A	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
<i>gyrB</i>	756	G zu A	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
	1311	T zu G	-	+	-	<i>M. caprae</i>
	1410	C zu T	+	-	-	<i>M. bovis</i>
	1450	G zu T	+	+	-	<i>M. caprae</i> , <i>M. bovis</i>
<i>lepA</i>	690	C zu T	-	+	-	<i>M. caprae</i>

Modifiziert nach Domogalla (DOMOGALLA, 2014a)

T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin

+ SNP ist vorhanden

- SNP ist nicht vorhanden

4 Rindertuberkulose - Epidemiologie

4.1 Vorkommen und Bedeutung als Zoonose

Die bovine Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Tierseuche mit zoonotischem Potential und stellt ein globales Problem für die öffentliche Gesundheit dar. Weltweit ist die Krankheit verantwortlich für große wirtschaftliche Verluste im Veterinärbereich, eine ernsthafte Bedrohung für das Ökosystem und verantwortlich für ca. 3,1 % der menschlichen Tuberkulose-Fälle (EL-SAYED et al., 2015). Zum jetzigen Zeitpunkt sind folgende 16 der 28 EU-Mitgliedsstaaten als frei von Rindertuberkulose anerkannt: Belgien, Tschechische Republik, Dänemark, Deutschland, Estland, Frankreich, Lettland, Luxemburg, Ungarn, Niederlande, Österreich, Polen, Slowenien, Slowakei, Finnland und Schweden (Entscheidung 2003/467/EG, in der Fassung vom 14.02.2014).

In Großbritannien und Irland ist die Tuberkuloseprävalenz bei Rindern noch immer sehr hoch und trotz Bekämpfungsmaßnahmen stetig steigend (REYNOLDS, 2006). Da der Dachs dort endemisch mit boviner Tuberkulose infiziert ist und ein dauerhaftes, potentiell Infektionsrisiko für Rinder darstellt, gestaltet sich eine endgültige Eradikation der Rindertuberkulose als problematisch (DELAHAY et al., 2001). In jüngerer Zeit wurde die Tuberkulose als größte Gefahr für die Rinderbestände in Großbritannien und Irland bezeichnet (WILSON et al., 2011).

In Spanien wurde die Rolle von Wildschwein und Rotwild als Wildtier-Reservoir und Infektionsquelle für Rinder und andere Wiederkäuer diskutiert (ARANAZ et al., 2004; VICENTE et al., 2006; NARANJO et al., 2008). Durch diese bestehenden Reservoirs ist die Tilgung der Tuberkulose auch in Spanien trotz eines „test and slaughter“-Programmes noch nicht gelungen (ARANAZ et al., 2004).

In Italien wurde ein verpflichtendes „test and slaughter“-Programm schon 1977 eingeführt. Allerdings sind bisher nur einige Regionen Italiens als amtlich frei von Rindertuberkulose anerkannt. Die Behörden in Regionen mit noch höheren Prävalenzen, welche vorrangig im Süden Italiens liegen, vollziehen spezielle Maßnahmen und Kontrollmaßnahmen um den OTF-Status (99,9 % der Rinderherden bTB-frei für mindestens sechs aufeinanderfolgende Jahre) zu erreichen (BONIOTTI et al., 2009).

Auch außerhalb von Europa ist die Rindertuberkulose ein bestehendes Problem für die Tiergesundheit. In Neuseeland konnte festgestellt werden, dass die dortigen Rinderherden durch mit infizierte Fuchskusus/Possums und durch infiziertes Farmwild angesteckt werden (TWEDDLE & LIVINGSTONE, 1994). In den USA, vor allem in Michigan, gilt der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) als bedeutende Infektionsquelle für Rinderherden (O'BRIEN et al., 2002).

Die Tuberkulose ist zwischen Mensch und Tier übertragbar und gilt somit als Zoonose. Da die Mitglieder des MTC im Allgemeinen ein breites Wirtsspektrum aufweisen, kann sich der Mensch generell infizieren (O'REILLY & DABORN, 1995; PRODINGER et al., 2002). Auch eine direkte Übertragung von *M. bovis* und *M. tuberculosis* vom Menschen auf das Rind ist beschrieben (FRITSCHKE et al., 2004; THAKUR et al., 2012). Besonders gefährdet für eine Übertragung sind Menschen, die in direktem Kontakt mit erkrankten Tieren stehen. Dazu gehören Arbeiter in landwirtschaftlichen Betrieben und im Schlachthof, Veterinäre, Jäger und Tierpfleger in Zoos (TORRES-GONZALEZ et al., 2013). Auch für alle andere Menschen stellt der Konsum von Rohmilchprodukten ein Infektionsrisiko dar (PRICE, 1934), jedoch wurde dies durch die Pasteurisierung der Milch nahezu eliminiert (HARRINGTON & KARLSON, 1965). Auch *M. caprae* wird über Rohmilch und Rohmilchprodukte und über direkten Kontakt zum erkrankten Tier auf den Menschen übertragen. So kann eine Infektion mit *M. caprae* beispielsweise Lupus vulgaris, die häufigste Form der Hauttuberkulose, auslösen (TAR et al., 2009). Eine Infektion des Menschen mit *M. caprae* kann aber ebenso pulmonale und andere extrapulmonale Formen der Tuberkulose auslösen (PRODINGER et al., 2002; BLAAS et al., 2003; KUBICA et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2009).

4.2 Rindertuberkulose in Deutschland, Österreich und der Schweiz

Die Rindertuberkulose ist eine anzeigepflichtige Tierseuche in Deutschland nach §1 der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TIERSEUCHANZV, 1991). Seit 1997 ist die Bundesrepublik Deutschland als amtlich frei von Rindertuberkulose nach der Entscheidung 97/76/EG anerkannt (ENTSCHEIDUNG 1999/467/EG). Seitdem wurden immer noch vereinzelt Fälle von Tuberkulose festgestellt, die den Status der Tuberkulosefreiheit jedoch nicht ernsthaft gefährden (MENGE et al., 2016). Seit dem Jahr 2008 werden allerdings

wieder verstärkt Rindertuberkulose-Ausbrüche, insbesondere im Allgäu in Bayern festgestellt (GERSTMAIR, 2011b). Eine Übersicht über die dokumentierten Ausbrüche in Deutschland von den letzten Jahren ist in Tabelle 2 dargestellt. Seitdem *M. caprae* als eigenständige Spezies anerkannt wurde (ARANAZ et al., 2003), werden die Erreger der Rindertuberkulose im Tierseuchennachrichten-System (TSN) getrennt erfasst. So wurden beispielsweise im November 2014 12.742.190 Rinder in 154.878 Betrieben gezählt und davon insgesamt 13 Ausbrüche erfasst, von denen neun *M.-caprae*-Infektionen in Bayern und eine *M.-caprae*-Infektion in Niedersachsen, und zusätzlich zwei Fälle einer *M.-bovis*-Infektion im Saarland und eine *M.-bovis*-Infektion in Niedersachsen festgestellt werden konnte. Im Norden wird also die Rindertuberkulose zumeist von *M. bovis* verursacht, wohingegen im Süden der Bundesrepublik eine Infektion überwiegend auf *M. caprae* zurückzuführen ist (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2014). Außerdem kann *M. caprae* im Süden Deutschlands nicht nur aus Rindern, sondern auch aus Rotwild isoliert werden (DOMOGALLA et al., 2013; FINK et al., 2015; RETTINGER et al., 2015).

Tabelle 2: Amtlich dokumentierte Rindertuberkulose-Ausbrüche in Deutschland, Jahresstatistik 2005 - 2016

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Deutschland	6	5	12	23	23	11	5	23	46	13	12	2

Datenquelle: TSN, Abfragedatum: 12.07.2016

Beim Menschen wurden in Deutschland im Jahr 2014 insgesamt 4.488 Tuberkulosefälle registriert. 67,0 % der Fälle wurden durch das MTC-Mitglied *M. tuberculosis* ausgelöst. Der zweithäufigste Erreger mit 1,6 % war *M. bovis*. *M.-caprae*-Infektionen beim Menschen wurde nicht eigenständig erfasst und fallen unter 9,4 % der nicht weiter differenzierten MTC-Infektionen (BRODHUN et al., 2015).

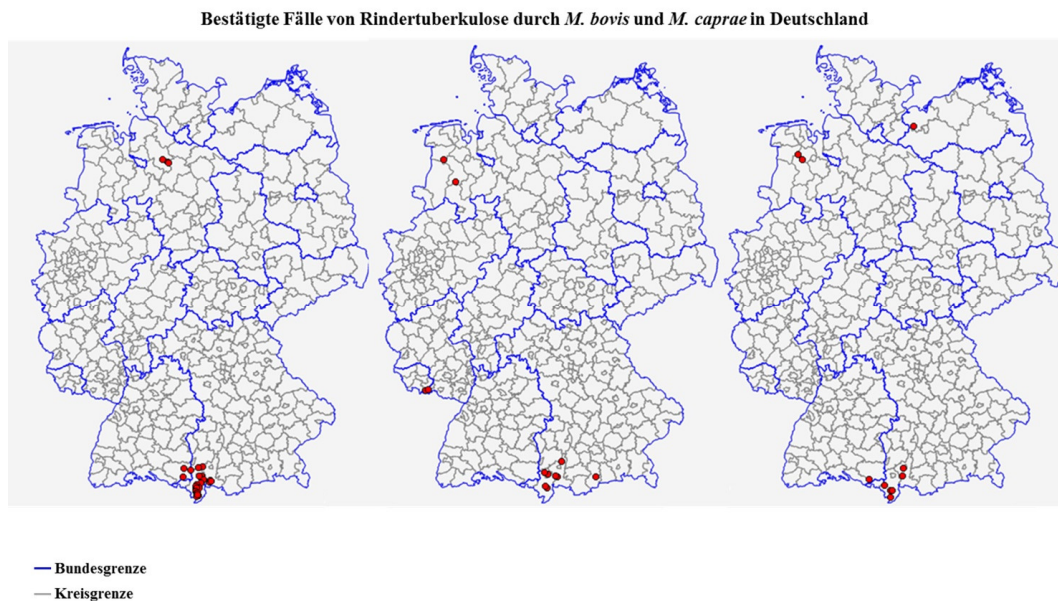


Abbildung 5: Geografische Verteilung der Rindertuberkulosefälle in Deutschland in den Jahren 2013 bis 2015

Datenquelle: TSN, Abfragedatum: 12.07.2016

Österreich wurde im Jahr 1999 nach erfolgreichem „test and slaughter“-Programm durch die Europäische Union als frei von Rindertuberkulose anerkannt (OTF) und stellte danach auf Monitoring-Programme während der Fleischbeschau und der Schlachtkörperuntersuchung um (SCHOEPF et al., 2012). Vereinzelt wurden jedoch immer wieder bTB-Fälle im Rotwild festgestellt. Ähnlich zur damaligen Situation in Deutschland wurden auch in Österreich, Tirol, im Jahr 2008 wieder steigende bTB-Fallzahlen registriert, mit der Konsequenz, dass Langzeitstudien zur aktuellen bTB-Lage im Rotwild mit gezielter Beprobung eingeleitet wurden und vor allem gealpte Rinder aus gefährdeten Regionen flächendeckend tuberkulinisiert wurden (SCHOEPF et al., 2012; FINK et al., 2015).

Die Schweiz ist gemäß OIE Definition bereits seit 1960 tuberkulosefrei (SCHÖNING et al., 2013). In allen angrenzenden Ländern an die Schweiz und Lichtenstein wurden jedoch wieder vermehrt bTB-Fälle festgestellt: In Süddeutschland wurde vorrangig der Erreger *M. caprae* aus Rotwild und Rindern isoliert (GERSTMAIR, 2011a), im Rotwild in Österreich wurden steigende Fallzahlen verbucht (PRODINGER et al., 2002) und in Norditalien wurde grenznah *M. bovis* in 3 % der Wildschweine nachgewiesen (DONDO et al., 2007).

Schöning et al. entdeckten erstmals das MTC-Mitglied *M. microti* in zwei Schweizer Wildscheinen, jedoch wurden weder *M. bovis* noch *M. caprae* bei diesen Studien detektiert und vier MTC-Isolate aus Wildschweinen konnten nicht näher spezifiziert werden. Sie fanden ebenfalls heraus, dass die immer größer werdenden wilden Huftierpopulationen und das Wiederauftauchen der bTB in direkten Nachbarländern Risiken für die Entstehung eines Wildtierreservoirs darstellen könnten, jedoch zum Zeitpunkt der Studie noch kein detektierbares Reservoir in der Schweiz bestand (SCHÖNING et al., 2013; FINK et al., 2015).

5 Infektion und Pathogenese

5.1 Übertragung und Infektion

Die Mitglieder des MTC können auf unterschiedlichen Wegen zwischen verschiedenen Spezies übertragen werden. Die Erregerübertragung kann sowohl direkt von Tier zu Tier, als auch indirekt über unbelebte Vektoren erfolgen. Die direkte Übertragung bei Tieren erfolgt dabei meist über erregerhaltige Sekrete, z. B. aus dem Respirationstrakt infizierter Rinder oder auch über die Milch, aber es wurde auch von perkutanen, kongenitalen und genitalen Infektionen berichtet (NEILL et al., 1994). Abhängig vom mit Tuberkulose infiziertem Organ können die Erreger über Atemluft, Kot, Sekrete des Urogenitaltraktes oder Milch ausgeschieden werden (SMITH, 2003). Wird der Erreger aerogen verbreitet, reichen schon extrem geringe Keimzahlen für eine Infektion. Während für eine alimentäre Infektion 13 Millionen Mykobakterien aufgenommen werden müssen, reichen nur fünf bis zehn Mykobakterien für eine aerogen Übertragung und Infektion aus (MORRIS et al., 1994; DEAN et al., 2005). Indirekt erfolgt die Übertragung über kontaminiertes Futter, Tränken, Weiden, aber auch über Inhalation von erregerhaltigem Staub (eingetrocknetes Sputum ausscheidender Tiere) von infizierten Rindern und auch Wildtieren (MENZIES & NEILL, 2000; TRAUTWEIN, 2006). Auch der gemeine Regenwurm (*Lumbricus terrestris*) trägt zu der Verbreitung von *M. bovis* aus erregerhaltigem Rinderkot in der näheren Umgebung, vor allem in der Erde, bei (BARBIER et al., 2016). In der Studie von Barbier et al. wurde darüber hinaus gezeigt, dass kontaminierte Regenwürmer in frischer, *M.-bovis*-freier Erde, den Erreger über vier Tage lang verbreiten können. Diese aktuelle Studie unterstreicht erstmalig die Rolle von Regenwürmern bei der

möglichen Verbreitung und der Persistenz von *M. bovis* in Böden innerhalb von bTB Endemie-Gebieten. Zusätzlich ist zu bedenken, dass der Regenwurm das Hauptnahrungsmittel für Dachse darstellt, die ein Reservoirwirt in Großbritannien darstellen und maßgeblich an der Verbreitung der bTB beteiligt sind (BARBIER et al., 2016). Da bei pathologisch-anatomischen Untersuchungen häufiger tuberkulöse Veränderungen in Form von Granulomen im oberen und unteren Respirationstrakt und den zugehörigen Lymphknoten zu finden waren, wird davon ausgegangen, dass die Inhalation des Erregers und somit die aerogene Übertragung am häufigsten vorkommt (FRANCIS, 1958; CORNER, 1994; WHIPPLE et al., 1996; NEILL et al., 2005). Diverse Studien konnten außerdem zeigen, dass *M. bovis* vorwiegend über Nasensekret und Trachealschleim sowohl bei experimentell als auch bei natürlich infizierten Rindern, ausgeschieden wird und so auch andere Rinder infizieren kann (NEILL et al., 1988; NEILL et al., 1989). Aber auch die Aufnahme von kontaminierte Milch durch Kälber und die Aufnahme kontaminierter Milch als Rohmilch durch Kinder kann eine alimentäre Infektion nach sich ziehen (PRICE, 1934; EVANGELISTA & DE ANDA, 1996). Des Weiteren konnte bei Rindern, die experimentell mit *M. bovis* infiziert worden sind, eine Ausscheidung von *M. bovis* über den Kot nachgewiesen werden, was zu einer Kontamination der Umgebung führte (MENZIES & NEILL, 2000).

5.2 Pathogenese

Die Pathogenese der bovinen Tuberkulose beim Rind ist bisher nicht so gut untersucht wie die der Tuberkulose des Menschen und ist sehr komplex (NEILL et al., 2001; NEILL et al., 2005). Die hier beschriebene Pathogenese leitet sich vorrangig aus Studien ab, die anhand experimentell infizierter Großtier-, besonders Rindern, erfolgten, um Studien zur Pathogenese durchzuführen (NEILL et al., 1994; BUDDLE et al., 1995; CASSIDY et al., 1999).

Die bovine Tuberkulose ist in erster Linie eine chronisch-granulomatöse, käsig-nekrotisierende, entzündliche Erkrankung der Atemwege (DOMINGO et al., 2014). Inhalation ist der häufigste Infektionsweg, was zu granulomatösen Veränderungen im Gewebe von Nasopharynx, Lunge und assoziierten Lymphknoten führt. Abhängig vom Eintrittsort der Bakterien, können aber genauso andere Organe, wie z. B. Mesenterial-Lymphknoten bei oraler Aufnahme, Knochen und andere Organe (extrapulmonale Form) betroffen sein (PETO et al., 2009).

Bei Eintritt des Erregers in den Wirt bildet sich abhängig vom Infektionsweg an der Eintrittsstelle der sogenannte „Primärherd“. Unter Beteiligung des regionalen Lymphknotens werden Eintrittsstelle und Reaktion im Lymphknoten unter dem Begriff „Primärkomplex“ zusammengefasst (WALLGREN, 1948). Eine Entwicklung von sichtbaren Läsionen ist eine Folge der Immunantwort auf die Gewebeinvasion des Erregers. Daher entwickeln sich diese erst später im Verlauf der Infektion als makroskopisch sichtbare Ansammlungen von Immunzellen (Granulome oder Tuberkel, siehe Abbildung 6) (VORDERMEIER et al., 2008). Die Läsionen treten in der Regel als sehr kleine, feste Knötchen auf, die weißlich oder gelblich gefärbt sind (siehe Abbildung 7). Im Inneren der infizierten Herde liegen die Makrophagen, die in der Regel ein unverwechselbares Erscheinungsbild als Epitheloidzellen haben (siehe Abbildung 8). Fusionieren Makrophagen im Zuge der granulomatösen Entzündung, bilden sie die Langerhans'schen Riesenzellen. Diese Epitheloid- und Riesenzellen bilden das Zentrum der jungen Tuberkel und sind durch einen Wall von Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten umgeben. Im weiteren Verlauf der Infektion entwickelt der Tuberkel eine periphere fibröse Kapsel mit einer zentralen, nekrotischen Verkäsung. Auch eine Mineralisierung im Bereich der zentralen Verkäsung wurde beobachtet (NEILL et al., 2001).

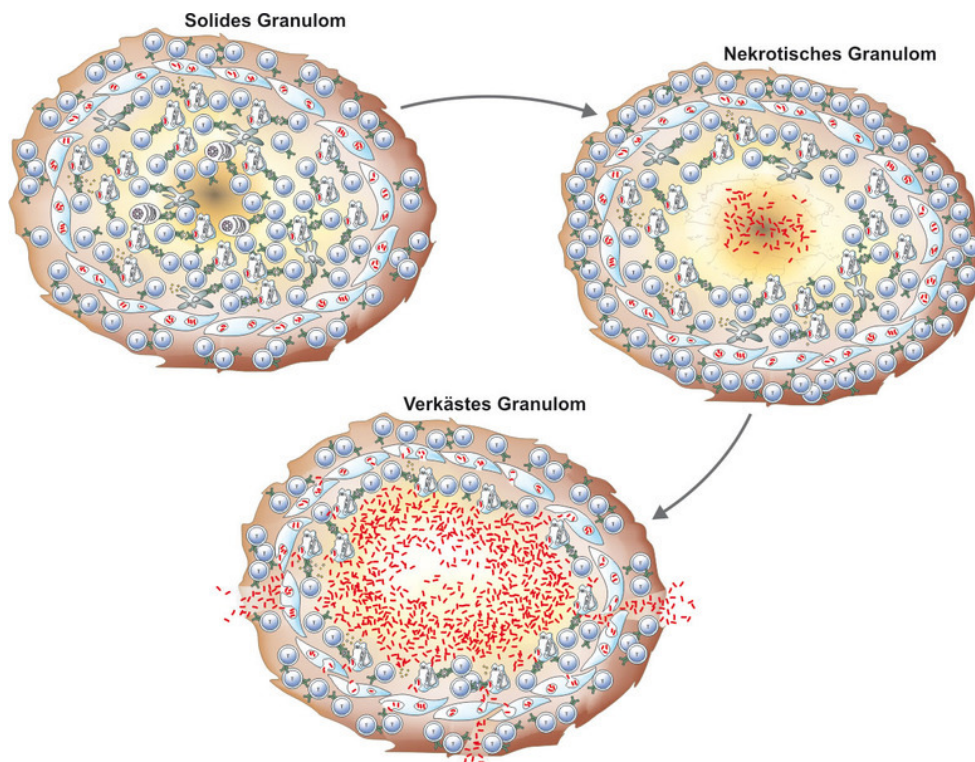


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Granuloms in unterschiedlichen Stadien bei der Tuberkulose des Menschen

Strukturierte, solide Granulome können die Tuberkuloseerreger erfolgreich eindämmen. Nekrotische Granulome enthalten in ihrem Zentrum einen nekrotischen Kern aus abgestorbenen Zellen. Hier können sich die Erreger vermehren. Verkäste Granulome sind nicht mehr strukturiert. Es entsteht eine käsige Masse, die aus zerfallenen Wirtszellen und lebenden und abgestorbenen Keimen zusammengesetzt ist.

Modifiziert nach Kaufmann (KAUFMANN, 2011)



Abbildung 7: Granulomatöse Veränderung in einem Lymphknoten eines mit *M. caprae* infizierten Rindes, Januar 2014

Das Foto zeigt einen vertikal durchgeschnittenen Lungenlymphknoten eines im Rahmen der staatlichen Tierseuchenbekämpfung getöteten Rindes mit bTB-Verdacht. Der Pfeil markiert eine granulomatöse Veränderung im Parenchym des Lymphknotens. Das Tier wurde im weiteren Verlauf mittels real-time PCR als bTB-positiv bestätigt. Durch weitere Untersuchungen war eine Erregerdefinition als *M. caprae* möglich.

Die Funktion des Granuloms liegt in der Abkapselung der Infektion um die weitere Ausbreitung in umliegendes Gewebe zu verhindern und die Immunantwort direkt am Punkt der Infektion zu konzentrieren (FLYNN & CHAN, 2001).

Je nach Immunstatus des Tieres kann es zu verschiedenen Verlaufsformen kommen. Bei einem intakten Immunsystem kann der Erreger eliminiert werden und die Läsion vollständig abheilen (NEILL et al., 2001) oder es kommt zu einer persistierenden Infektion ohne klinische Manifestation, bei der der Erreger vom Wirtsimmunsystem in Granulomen/Tuberkeln eingeschlossen wird und sich so zunächst nicht weiter verbreiten kann (SMITH, 2003). Hat das Tier bei Erstinfektion jedoch einen schlechten Immunstatus, kann es direkt nach einer Infektion mit pathogenen Mykobakterien zu einer Generalisation durch vor allem

lympho-hämatogene Ausbreitung des Erregers kommen (NIEBERLE, 1938; SMITH, 2003). Der Erreger kann sich dann in die verschiedenen Organe ausbreiten und sich als Miliartuberkulose manifestieren (WALLGREN, 1948). Dieser Prozess kann auch erst nach Monaten bis Jahren infolge einer Immunsuppression in Gang gesetzt werden, wenn eine länger zurückliegende Infektion reaktiviert wird. In diesem Zuge kann sich auch eine isolierte chronische Organtuberkulose etablieren, die meistens die Lunge oder das Euter betrifft. Kennzeichen der chronischen Organtuberkulose sind, dass sie erst einige Zeit nach der Primärinfektionsphase auftritt, nur das infizierte Organ ohne die zugehörigen Lymphknoten betroffen ist und der tuberkulöse Prozess sich auf kanalikulärem Weg innerhalb des Organes ausbreitet und die lympho-hämatogene Streuung in den Hintergrund rückt. Vermindert sich die Resistenzlage im Laufe der Zeit durch andere Krankheiten oder Stressfaktoren, kommt es dann zur sogenannten Niederbruchphase, bei der es zur Erregergeneralisation kommt (NIEBERLE, 1938; PALLASKE, 1961). Tritt eine Ausscheidung des Erregers nach außen auf, spricht man von einer infektiösen bzw. offenen Tuberkulose (PARRISH et al., 1998).

Es wurde berichtet, dass eine Bakteriämie während der post-primären Verbreitung im Menschen stattfindet. Dies wurde auch für Rinder nachgewiesen (LEPPER et al., 1977). Außerdem gab es eine Studie in Indien, in der das Blut von scheinbar gesunden Rindern mittels Kultur untersucht wurde und daraus *M. bovis* angezüchtet werden konnte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass *M. bovis* im Blut von subklinisch infizierten Rindern in einem höheren Ausmaß zirkuliert, als ursprünglich erwartet (SRIVASTAVA et al., 2008).

Neue Studien berichten, dass in Blutproben von Rindern, die im Single Comparative Cervical Intradermal Tuberculin (SCCIT-) Test positiv getestet wurden, lebensfähige MTC-Mitglieder mittels Phage-PCR nachgewiesen werden konnten. Dies galt sowohl für Tiere mit „visible lesions“ als auch für Tiere mit „non visible lesions“ (SWIFT et al., 2016).

6 Immunologie

6.1 Zelluläre Immunantwort

Immunhistologische Untersuchungen von granulomatösen Läsionen im Anfangsstadium von experimentell mit *M. bovis* infizierten Rindern haben gezeigt, dass T-Lymphozyten mit die ersten Zellen sind, die an einer Immunreaktion auf bovine Tuberkulose beteiligt sind (CASSIDY et al., 2001). Dies unterstreicht die Bedeutung der zellvermittelten Immunantwort (Cell-mediated immune response, CMI) im Zusammenhang mit boviner Tuberkulose und wurde bereits durch einige experimentelle und Feldstudien bestätigt, die ein komplexes Spektrum von Immunreaktionen mit früher T-Zell-Beteiligung beschrieben haben (POLLOCK et al., 2001). Zudem ist allgemein bekannt, dass die CMI bei einer Infektion mit MTC-Mitgliedern, die wichtigste Immunreaktion darstellt (NEILL et al., 1994). Neben den T-Zellen sind vorrangig Makrophagen und ihre Abkömmlinge Epitheloidzellen und mehrkernige Riesenzellen und auch neutrophile Granulozyten an der Immunreaktion beteiligt (PALMER et al., 2007).

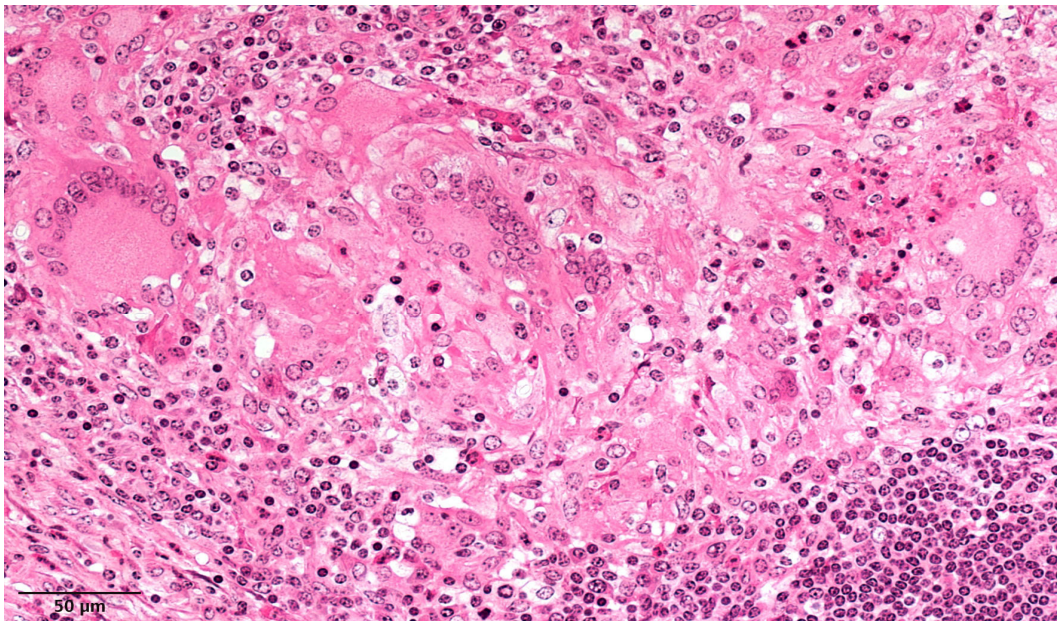


Abbildung 8: Mesenterial-Lymphknoten eines Rindes mit boviner Tuberkulose

Tuberkulose beim Rind, verursacht durch *M. caprae*; granulomatöse Entzündung in einem Mesenterial-Lymphknoten unter Beteiligung von mehrkernigen Riesenzellen vom Langhans-Typ, Epitheloidzellen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Kunststoff-Einbettung, HE-Färbung, Sektions-Nr. S_598_14

Zur Verfügung gestellt vom Institut für Tierpathologie der LMU München

Im Zuge der T-Zell-Antwort wurden alle wesentlichen T-Zell-Untergruppen ($\gamma\delta$ -T-Zellen, $CD4^+$ - und $CD8^+$ -, $\alpha\beta$ -T-Zellen, NKT-Zellen) in der antimykobakteriellen Immunantwort bei Rindern nachgewiesen (SCHLUGER & ROM, 1998; POLLOCK et al., 2001; TORRADO et al., 2011). Bei Rindern, die experimentell mit *M. bovis* infiziert wurden, wurde die Dynamik der Lymphozytensubpopulation näher untersucht. Zunächst wurde eine sequentielle Beteiligung von $\gamma\delta$ -, dann von $CD4^+$ - und im späteren Infektionsverlauf eine zunehmende Beteiligung von $CD8^+$ -T-Zellen nachgewiesen (POLLOCK et al., 1996). Von besonderer Bedeutung bei der Verteidigung gegen intrazelluläre Pathogene ist die Etablierung einer T-Helferzellen Typ 1(Th1)-Immunreaktion, charakterisiert durch $IFN-\gamma$ -Produktion, die für die Makrophagen-Aktivierung essentiell ist (POLLOCK & NEILL, 2002). Neben $IFN-\gamma$ produzieren Th1-Zellen noch Interleukin 2 (IL-2), das wiederum die Th1-Proliferation fördert, was wiederum unter anderem durch eine erhöhte $IFN-\gamma$ -Produktion zu einer erhöhten Makrophagen-Aktivierung führt (SAKAMOTO, 2012). T-Helferzellen Typ 2 (Th2-Zellen) produzieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 (SCHLUGER & ROM, 1998).

$CD4^+$ -Zellen sind dafür zuständig, Effektorzellen wie Makrophagen, $CD8^+$ -Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu aktivieren. Dazu muss ihnen zuerst ein bereits im Phagosom in Peptidfragmente zerlegtes Antigen auf einem major histocompatibility complex (MHC) II auf der Oberfläche einer Antigen Presenting Cell (APC, Makrophagen, dendritische Zellen, Monozyten) präsentiert werden (SCHLUGER & ROM, 1998).

$CD8^+$ -Zellen hingegen erkennen Antigenstrukturen, die auf MHC I Rezeptoren präsentiert werden, die auf der Oberfläche von nahezu allen kernhaltigen Zellen zu finden sind. Als zytotoxische T-Zellen können sie die Apoptose und Lyse von infizierten Makrophagen einleiten und Zytokine, besonders $IFN-\gamma$ und IL-4, produzieren (SCHLUGER & ROM, 1998).

$\gamma\delta$ -T-Zellen werden von Wiederkäuern in höherer Zahl exprimiert als von Menschen oder Mäusen (HEIN & MACKAY, 1991). Neben ihrer Funktion als zytotoxische Zellen (SCHLUGER & ROM, 1998) produzieren sie unter anderem IL-17, ein Zytokin, das für die frühe Granulombildung eine wichtige Rolle zu spielen scheint (TORRADO et al., 2011).

$\alpha\beta$ -T-Zellen interagieren mit dem CD1-Rezeptor auf der Oberfläche von APCs. Er ist dem MHC-Rezeptor ähnlich, kann jedoch bestimmte Lipide binden. Dies sind bei Mykobakterien vor allem Mykolsäuren. In ihrer Funktion sind sie ebenfalls zytotoxisch und sezernieren IFN- γ (BOOM et al., 2003).

6.2 Humorale Immunantwort

Wie bereits weiter oben beschrieben dominiert in frühen Infektionsstadien die zelluläre Immunantwort mit Th1-Zellen und Produktion von IFN- γ . Die Makrophagen werden durch Stimulation mit IFN- γ angeregt und produzieren reaktive ROI- und RNI- Verbindungen, die die intrazellulären Erreger töten sollen (FORRELLAD et al., 2013). Im weiteren Verlauf der Infektion kann es zu einer Verschiebung hin zu einer überwiegenden Th2-Antwort kommen, bei der die zelluläre Immunantwort in den Hintergrund tritt und es zu einer vermehrten Antikörper-Produktion (IgG1) kommt (RITACCO et al., 1991; BOUSSIOTIS et al., 2000; DLUGOVITZKY et al., 2000). Zusätzlich kann es zu einer anergistischen Phase kommen, in der infizierte Tiere keine nachweisbare zelluläre Immunantwort durch den Tuberkulintest zeigen, jedoch vermehrt Antikörper nachgewiesen werden können (NEILL et al., 1994). Das Auftreten der Antikörper ist jedoch auch häufig mit einer weiteren Ausbreitung der Krankheit und mit dem Auftreten von ausgeprägten pathologischen Veränderungen verbunden (WELSH et al., 2005).

Die Funktion der Antikörper liegt überwiegend in der Opsonisierung der Bakterien über Fc γ -Rezeptoren (ARMSTRONG & HART, 1975) und die Aktivierung des Komplementsystems (SCHLESINGER et al., 1990). Antikörper-markierte Bakterien können so von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten besser erkannt, aufgenommen und potentiell abgetötet werden (DE VALLIÈRE et al., 2005).

6.3 CMI basierende Diagnostik für bovine Tuberkulose

Da die CMI als erste feststellbare Reaktion nach einer Infektion mit Erregern der bovinen Tuberkulose gilt, können auf Basis einer allergischen Reaktion vom Typ IV (Intrakutan-Test) und der Messung von durch sensibilisierte T-Lymphozyten ausgeschüttetem IFN- γ (IFN- γ -Test) diagnostische Tests zur Diagnose einer bovinen Tuberkulose beim Menschen und beim Tier eingesetzt werden. Eine Schwäche der Testverfahren ist jedoch, dass zwischen einer akuten und einer

chronisch persistenten Infektion nicht unterschieden werden kann (VORDERMEIER et al., 2008). Auch zeigen die Testverfahren Schwächen in frühen Infektionsstadien, in denen noch keine ausreichende Immunantwort nachweisbar ist (GORMLEY et al., 2006) und in der Spätphase der Infektion bei Zusammenbruch der zellulären Immunantwort. In diesen beiden Phasen sind falsch-negative Testergebnisse möglich (MEDEIROS et al., 2010). Abbildung 9 zeigt die CMI basierenden diagnostischen Möglichkeiten. Die beiden Testverfahren werden in den folgenden Kapiteln (10.2) näher beschrieben.

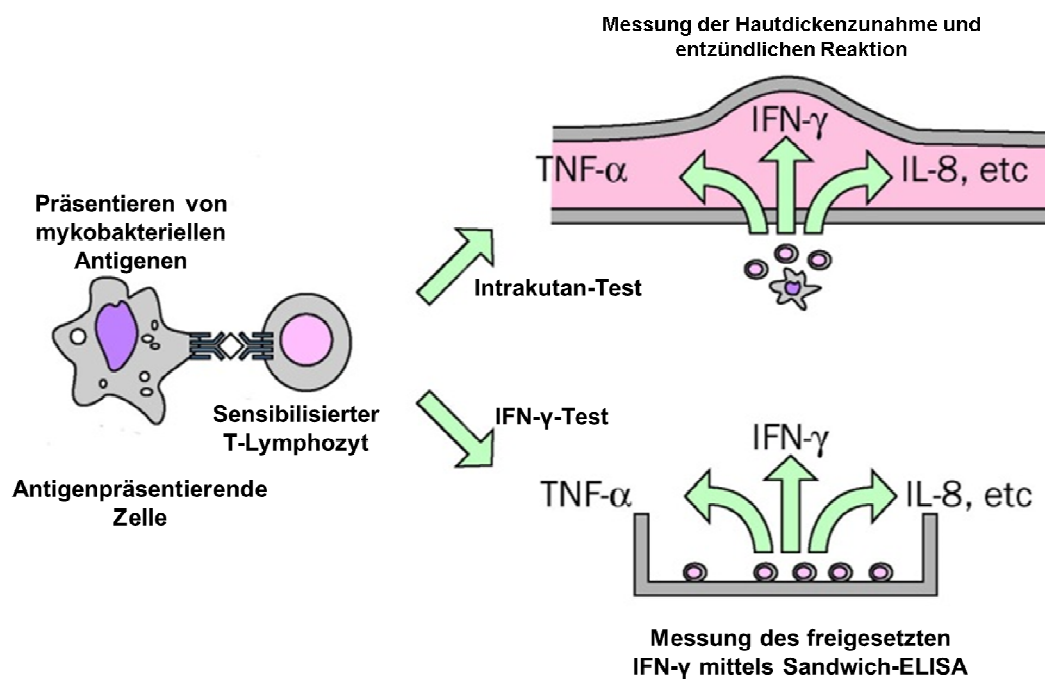


Abbildung 9: Schematische Darstellung der CMI basierenden diagnostischen Möglichkeiten für Tuberkulose

Modifiziert nach Andersen et al. (ANDERSEN et al., 2000)

7 Klinik

In der Regel ist die bovine Tuberkulose eine chronisch verlaufende Infektionskrankheit mit einer Inkubationszeit von Monaten bis Jahren, die im hohen Alter oder in Stressphasen reaktiviert werden kann. Allerdings kann sie auch selten einen akut-progressiven Verlauf nehmen. Dies ist jedoch selten in Ländern, in denen aufgrund von staatlichen Bekämpfungsprogrammen regelmäßige Untersuchungen in den Rinderbeständen durchgeführt werden und Reagenten frühzeitig eliminiert werden. Daher kann bovine Tuberkulose an Rindern nur sehr schwer über klinische Anzeichen diagnostiziert werden (RAMOS et al., 2015).

Je nach Phase und betroffenem Organ stellen sich die klinischen Anzeichen beim erkrankten Rind unterschiedlich dar. Zu diesen kommt es zumeist erst, wenn es zu einer chronischen Organtuberkulose oder einer generalisierten Erkrankung kommt. Dann zeigen erkrankte Tiere reduziertes Allgemeinbefinden, Fieber, Inappetenz, Anämie und Abmagerung. Je nach betroffenem Organ können auch weitere Veränderungen auftreten. Die Eutertuberkulose beispielsweise lässt sich in drei verschiedene Formen unterteilen. Bei einer miliartuberkulösen Mastitis kommt es zu vergrößerten Euterlymphknoten und miliaren Knötchen im Milchparenchym, die Milch zeigt dabei kaum makroskopisch sichtbare Abweichungen in Farbe, Geruch, Konsistenz oder Flocken. Bei einer chronischen lobulär-infiltrierenden Eutertuberkulose kommt es zu Veränderungen des Milchsekretes (flockig, wässrig, graugelb). Die dritte Form der Eutertuberkulose wird als Mastitis caseosa bezeichnet. Sie tritt als akute Mastitis in Erscheinung mit Wärme, Druckempfindlichkeit, Schwellung und Ödematisierung unter Einbezug der regionalen Lymphknoten (TRAUTWEIN, 2006).

Auch andere Studien beschreiben diverse klinische Veränderungen. In späteren Krankheitsstadien können Rinder Abmagerung, Schwäche, leichtes Fieber und Inappetenz zeigen. Tiere, bei denen vorwiegend die Lunge betroffen ist, zeigen meist feuchten, therapieresistenten Husten, der sich am Morgen und bei kaltem Wetter und Anstrengung verschlimmert. Dyspnoe oder Tachypnoe sind möglich. Bei Tieren, bei denen vorwiegend der Gastrointestinaltrakt betroffen ist, dominieren intermittierender Durchfall und Verstopfung als klinische Anzeichen. Bei manchen Tieren vergrößern sich die Retropharyngeal- und andere Lymphknoten, die später auch aufbrechen können. Ebenso können durch die vergrößerten Lymphknoten Blutgefäße, Atemwege und Teile des Verdauungstraktes verschlossen werden (RAMOS et al., 2015).

8 Therapie

8.1 Therapie und Prophylaxe des Menschen

Um eine Resistenzbildung zu vermeiden und die Erreger in unterschiedlichen Entwicklungsstadien abzutöten oder in der Vermehrung zu stoppen, wird die humane Tuberkulose nur mit einer Kombination aus bestimmten Medikamenten behandelt. Dafür stehen fünf Standardmedikamente zur Verfügung: Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Pyrazinamid (PZA), Ethambutol (EMB) und Streptomycin (SM), wobei SM als Zweitrangmedikament genutzt wird, da eine orale Verabreichung nicht möglich ist. Außerdem kommen bei Medikamentenunverträglichkeiten oder Komplikationen in Form von Resistenzen noch andere Reservemedikamente zum Einsatz.

Die Therapie einer Lungentuberkulose eines Erwachsenen wird standardmäßig über sechs Monate durchgeführt (Standard-Kurzzeittherapie). Initial in den ersten beiden Monaten werden die Medikamente INH, RMP, PZA und EMB verabreicht (Initialphase) und danach wird die Therapie mit INH und RMP aufrechterhalten (Stabilisierungs-/Kontinuitätsphase). Immer häufiger wird in den letzten Jahren allerdings von einer multiresistenten Tuberkulose (MDR-TB) berichtet. Dabei liegt eine gleichzeitige Resistenz mindestens gegenüber den beiden Erstrangmedikamenten INH und RMP vor. Bei der extensiv resistenten Tuberkulose (XDR-TB) sind die Erreger zusätzlich noch gegenüber einem der injizierbaren Tuberkulosemedikamente (Amikacin, Capreomycin, Kanamycin) und einem der Fluorochinolone resistent, was eine effektive Behandlung massiv erschwert (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2013).

Aktuelle Schätzungen ergeben, dass zum heutigen Zeitpunkt mehr als eine Milliarde Menschen mit dem BCG-Impfstoff geimpft wurden. Vor allem in Entwicklungsländern und in Ländern, in denen Tuberkulose endemisch vorkommt, werden noch heute die Neugeborenen geimpft, da die Impfung bei Kindern am wirkungsvollsten gegen die Form der extrapulmonalen Tuberkulose schützt (RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014). Allerdings verhindert die Impfung nicht die Erstinfektion mit dem Erreger, und noch wichtiger, nicht die Reaktivierung einer latenten Lungeninfektion, die die Hauptquelle für die Ausbreitung des Erregers darstellt (WHO, 2004).

8.2 Therapie der Haussäugetiere

Gemäß der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes sind Heilversuche grundsätzlich verboten. Wird Tuberkulose bei einem Tier in einem Bestand festgestellt, wird es getötet und unschädlich beseitigt und alle im Bestand verbleibenden Tiere, die älter als 6 Monate sind, werden nachfolgend mittels Tuberkulinhauttest untersucht. Bei positivem Ausgang der Tuberkulinprobe, werden die Reagenten ebenso getötet und bei einem zweifelhaften Ergebnis kann der Test frühestens nach sechs Wochen wiederholt werden oder ein IFN- γ -Test durchgeführt werden (RINDTB-VO, 2014).

Grundsätzlich wäre jedoch eine Therapie der Rindertuberkulose mittels des Antibiotikums Isoniazid/Isonicotinsäurehydrazid möglich (DORMER et al., 1961).

9 Bekämpfung in Deutschland

Bis in die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts war die Tuberkulose des Rindes auch in Deutschland eine mit hoher Prävalenz einhergehende Tierkrankheit. In den Jahren 1935 und 1936 gab es eine Tuberkulinisierungskampagne, in der circa 46.000 deutsche Bestände mit etwa 412.000 Rindern tuberkulinisiert wurden. Bei dieser wurde in rund 63 % der Bestände und bei 31 % der untersuchten Tiere Tuberkulose diagnostiziert. Die Bekämpfung der Tuberkulose bei Rindern basierte allerdings noch bis zum Jahr 1939 allein auf Ausmerzungen klinisch erkrankter Tiere, was zu wenig Erfolg bei der Reduktion der Tuberkulosefälle führte.

Im Jahr 1952 gab es nochmals eine flächendeckende Tuberkulinisierungskampagne mit staatlicher Unterstützung. Dabei zeigten sich wieder 59 % der Bestände und circa 38,5 % der Tiere als mit Tuberkulose infiziert. Somit gab es eine freiwillige Tuberkulose-Bekämpfungskampagne, bei der nicht nur klinisch erkrankte Ausscheider, sondern bereits positive Tuberkulinreagenten ausgemerzt wurden. Daraufhin konnten im Dezember 1961 98,34 % der 1,2 Mio. Rinderhaltungsbetriebe und 99,75 % der Rinder in Westdeutschland den Status „tuberkulosefrei“ erreichen, in Ostdeutschland wurden ähnliche Ergebnisse im Jahr 1978 erzielt, nachdem im Jahr 1968 die „Weisung Nr. 7 zur Tierseuchenord-

nung - Verhütung und Bekämpfung der Rindertuberkulose“ herausgegeben wurde (MOSER et al., 2014).

Im Jahr 1964 wurde mit der Richtlinie 64/432/EWG von der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft ein Regelwerk verfasst, das den Mitgliedsländern den Standard in Bezug auf die Definition des Status der Tuberkulose-Freiheit vorgab. Nach dieser Definition bekam ein Mitgliedsland den „Officially Tuberculosis Free“- (OTF-) Status, wenn bei nicht mehr als 0,1 % der rinderhaltenden Betriebe in sechs aufeinanderfolgenden Jahren jeweils zum Stichtag 31. Dezember des jeweiligen Jahres Tuberkulose nachgewiesen wurde (heutiger Stand: zehn aufeinander folgende Jahre nach Richtlinie 99/467/EG). Das vereinigte Deutschland ist seit dem 17.12.1996 gemäß der Entscheidung der Kommission der Europäischen Union (97/76/EWG) offiziell frei von Rindertuberkulose (MOSER et al., 2014; MENGE et al., 2016). Die Europäische Union behält sich allerdings durch die Richtlinie 64/432/EWG, Anhang A; I.Nr.5 das Recht vor, den Status auszusetzen oder ihn zu entziehen, sollte sich die Seuchenlage im Mitgliedsstaat grundlegend ändern.

Um das Ziel des OTF-Status zu erreichen, wurde schon am 03.08.1965, in der Bundesrepublik die erste Verordnung zum Schutz vor Rindertuberkulose erlassen, nachdem einige Tage zuvor, am 26.07.1965, die Rindertuberkulose nach Viehseuchengesetz zur anzeigepflichtigen Tierseuche erklärt wurde. Bis heute wurden diese nationale Verordnung, die zuletzt durch Art. 16 vom 17.04.2014 geändert wurde und ebenso die europäische Richtlinie, die zuletzt durch die Verordnung (EG) Nr. 21/2004 des Rates vom 17.12.2003 geändert wurde, mehrfach überarbeitet und an den derzeitigen Kenntnisstand angepasst (MOSER et al., 2014).

Nach Erreichen des OTF-Status in Deutschland wurden auf eine regelmäßige und flächendeckende Tuberkulinisierung der Rinderbestände aufgrund des großen finanziellen und logistischen Aufwands bei einer geringen Anzahl zu erwartender positiver Reagenten verzichtet. Kontrolliert wurden Schlachtrinder durch die amtliche Fleischuntersuchung am Schlachthof und nur bei Auffälligkeiten wurden im Herkunftsbetrieb des auffälligen Tieres Tuberkulinisierungen durchgeführt. Dies ist bis heute so. Allerdings war die Rindertuberkulose in Deutschland zu keiner Zeit völlig eliminiert (MOSER et al., 2014). Dies zeigte sich besonders im Anstieg der Fallzahlen der letzten Jahre, beginnend im Jahr 2008. Nach diesen

steigenden Fallzahlen schlug das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz vor, die flächendeckende Tuberkulinisierung wieder einzuführen, was jedoch vom Bundesrat am 12.06.2009 abgelehnt wurde. Daraufhin wurde in den Jahren 2009, 2012, 2013 und zuletzt im Jahr 2014 die Tuberkulose-Verordnung weiter überarbeitet mit dem Ziel, die Diagnose von Rindertuberkulose mittels neuer Diagnostik-Methoden zu sichern und zu beschleunigen. Dazu wurden eine serologische (IFN- γ -Freisetzungstest) und eine molekularbiologische Nachweismethode (Polymerase-Kettenreaktion) aufgenommen. Nach einem positiven immunologischen Ergebnis durch Tuberkulin-Hauttest oder Interferon-Gamma-Freisetzungstest muss das Ergebnis durch eine bakteriologische oder molekularbiologische Untersuchung erneut bestätigt werden. Außerdem wurde nach der Neufassung der Verordnung am 12.07.2013 der Tuberkulin-Hauttest als Ergänzung zur Fleischuntersuchung in §2a wieder aufgenommen. Demnach sollten bundesweit alle über 24 Monate alten Rinder bis zum 30.04.2014 mittels Stichprobenuntersuchung im Simultantest auf Rindertuberkulose getestet werden (RINDTB-VO, 2014).

Trotz steigender Fallzahlen in der Bundesrepublik ist der OTF-Status derzeit nicht ernsthaft gefährdet (MENGE et al., 2016).

10 Diagnostik

10.1 Verdachtsdiagnose

10.1.1 Klinische Untersuchung

Wie bereits im Kapitel 7 beschrieben, fehlen bei Rindern die klinischen Anzeichen einer Tuberkulose in der Regel bis sie umfangreiche Läsionen entwickelt haben (OIE, 2009). Der Krankheitsausbruch äußert sich allenfalls durch unspezifische klinische Veränderungen wie Leistungsabnahme, Abmagerung und Inappetenz oder chronisch therapieresistentem Husten (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2014). Somit ist allenfalls das Stellen einer Verdachtsdiagnose anhand klinischer Anzeichen möglich (TRAUTWEIN, 2006).

10.1.2 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Wie bereits im Kapitel 5.2 beschrieben, ist die Entwicklung von sichtbaren Läsionen eine Folge der lokalen Immunreaktion des Wirtes auf den Erreger. Sie stellt also eine spätere Phase im Krankheitsverlauf dar (GORMLEY et al., 2006). Sichtbare Läsionen können daher in frühen Infektionsstadien fehlen (MORRISON et al., 2000). Da eine Generalisierung der Erkrankung in Ländern, in denen aufgrund von staatlichen Bekämpfungsprogrammen regelmäßige Untersuchungen in den Rinderbeständen durchgeführt werden und Reagenten frühzeitig eliminiert werden, eher selten ist (COSTELLO et al., 1997; DOMINGO et al., 2014; RAMOS et al., 2015), stellt die zunächst nur lokalisierten Manifestation der bovinen Tuberkulose in Form von sehr wenigen und kleinen Granulomen für die Schlachtkörperbeschau bei einem Schlachtkörper mit einem Gewicht zwischen 300 und 600 kg eine Herausforderung dar (CORNER et al., 1990; MORRISON et al., 2000). Die Granulome sind beim Rind je nach Eintrittspforte meist im Respirations- oder Gastrointestinaltrakt und ihren zugehörigen Lymphknoten lokalisiert (MCCORRY et al., 2005; GORMLEY et al., 2006) und befinden sich daher in Organen, die im Rahmen der Schlacht tier- und Fleischuntersuchung nicht immer routinemäßig und aufmerksam genug auf das Vorhandensein von tuberkulösen Läsionen untersucht werden (VORDERMEIER et al., 2008). Außerdem gibt es auch Tiere, die im Tuberkulintest positive Ergebnisse aufweisen, aber keine makroskopisch sichtbaren Läsionen (non visible lesions) aufzeigen (CORNER, 1994; CASSIDY, 2006). Dazu gehören vor allem Tiere in frühen Infektionsstadien oder Tiere, bei denen eine chronisch rekurrente Tuberkulose vorliegt (GORMLEY et al., 2006).

10.2 Indirekter Erregernachweis

Generell kann über den Nachweis einer CMI eine Mykobakterien-Infektion festgestellt werden, allerdings lassen sich keine Rückschlüsse hinsichtlich einer Manifestation der Krankheit ziehen. Der Nachweis einer Antikörperreaktion hingegen steht anscheinend mit dem Fortschreiten der Erkrankung und einer Entwicklung von pathologischen Veränderungen im Zusammenhang. Daher werden Antikörper auch erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung gebildet (WATERS et al., 2011). Rindertuberkulose ist eine Krankheit mit einem breiten Spektrum in der Immunantwort bei der zunächst die zelluläre Immunantwort überwiegt und sich die Balance im fortschreitenden Krankheitsverlauf zugunsten

einer Antikörper-basierten Immunantwort verschiebt (RITACCO et al., 1991; POLLOCK & NEILL, 2002; WELSH et al., 2005). Der Verlauf der Immunantwort eines Rindes nach einer bTB-Infektion und die indirekten Testverfahren sind schematisch in Abbildung 10 dargestellt.

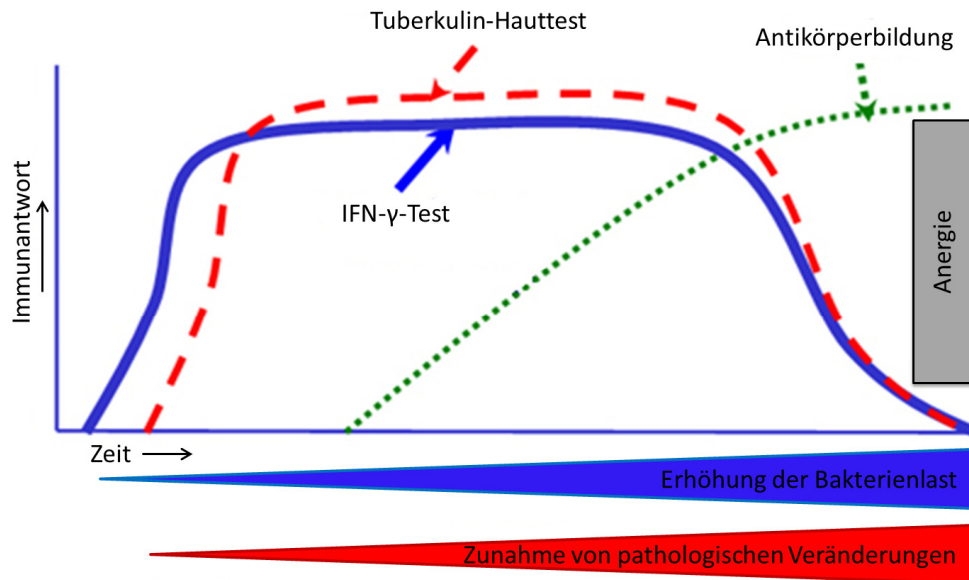


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Spektrums der Immunantworten des Immunsystems des Rindes und die verschiedenen indirekten Tuberkulose-Testverfahren

Modifiziert nach de la Rua-Domenech et al. (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006)

10.2.1 Intrakutan-Test

Die intrakutane Injektion von Tuberkulin gilt als wirksamste und wichtigste Methode um bovine Tuberkulose am lebenden Tier zu diagnostizieren (TRYLICH, 1960) und wird in Europa vor allem als Monotest und als Simultantest am Hals eingesetzt (PUCKEN et al., 2015). Das Prinzip des Testes beruht darauf, dass es die Zunahme der Hautdicke aufgrund einer Zell-medierten Immunantwort drei Tage nach intrakutaner Injektion eines hochgereinigten Tuberkulins, des sogenannten PPDs (purified protein derivate) in die kaudale Nackenfalte am Hals, misst (SCHILLER et al., 2010b). Bei einer vorausgegangenen Infektion mit Mykobakterien des Wirtes wird durch die intrakutane Injektion des Tuberkulins eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ ausgelöst (WOOD et al., 1990). Diese lokale Immunreaktion ist in Form einer Schwellung

72 Stunden post injectionem sichtbar und messbar (MONAGHAN et al., 1994).

Injiziert wird ein hochgereinigtes Tuberkulin, das sogenannte PPD. Zur Herstellung des bovinen PPD wird weltweit der *M.-bovis*-AN5-Stamm verwendet. Die Standardisierung von Tuberkulin ist ein kritischer Punkt für die Testgenauigkeit (SCHILLER et al., 2010b). Variationen in der PPD-Produktion können zu unterschiedlichen Antigenprofilen und so auch zu Qualitätsunterschieden führen (TAMENI et al., 1998). Die Wirksamkeit des hergestellten Tuberkulins wird über biologische Methoden bewertet. Dabei werden die Tuberkulin-Chargen in sensibilisierte Meerschweinchen oder Rinder injiziert und gegen einen internationalen Referenzstandard verglichen (SCHILLER et al., 2010b). Diese in vivo Studien variieren jedoch von Natur aus und sind wenig präzise (GOOD et al., 2011). In einem Vergleich kommerziell erhältlicher Tuberkuline wurde außerdem gezeigt, dass, wenn es in einer Dosis von 1 mg/ml angewendet wird, die meisten der getesteten Tuberkuline nicht die minimale Dosis von 2.000 International Units enthielten. Die Potenzen variierten dabei deutlich stärker bei bovinem Tuberkulin im Vergleich zu aviärem Tuberkulin, aber auch im Hinblick auf die relativen Potenzen von den Tuberkulin-Paaren (PPD-B und PPD-A). Da diese Tuberkuline aktuell in staatlichen Kontrollmaßnahmen und Bekämpfungskampagnen Anwendung finden, könnten diese Variationen direkte Auswirkungen auf die Diagnose von bovinen Tuberkulosefällen haben. Daher würden Verbesserungen und Standardisierung in der Produktion, Testung und Qualitätskontrolle die Sensitivität und Spezifität des Tuberkulin-Testes verbessern (SCHILLER et al., 2010b).

Der Intrakutan-Test kann auf unterschiedliche Art durchgeführt werden und wird in vielen Ländern unterschiedlich angewendet (SCHILLER et al., 2010a).

In Deutschland werden die genauen Bedingungen, die Durchführung und die Auswertung des Testes durch die Richtlinie 64/432/EWG, Anhang B, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1226/2002, geregelt.

Wird der zervikale Monotest eingesetzt, wird bovines Tuberkulin (PPD-B) am Hals intrakutan injiziert. Bei einem vorausgegangenem Kontakt des Rindes mit Mykobakterien kommt es 72 Stunden post injectionem zu einer allergischen Reaktion Typ IV (verzögerter Typ), die sich durch Schwellung, Schmerz, Verhärtung und vermehrter Wärme an der Applikationsstelle bemerkbar macht.

Der Monotest gilt dann als positiv, wenn die Hautfaltendicke bei Messung nach 72 Stunden um mindesten 4 mm zugenommen hat oder klinisch sichtbare Veränderungen an der Injektionsstelle, wie diffuser oder extensiver Ödembildung, Ulzeration, Anzeichen von Nekrose, oder sichtbare Entzündungen der Lymphknoten oder Lymphgänge , auftreten (PUCKEN et al., 2015).

Der Monotest hat eine Sensitivität von 80,0 - 91,0 % und eine Spezifität von 75,5-96,8 % (SCHILLER et al., 2010b).

Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, die durch das gemeinsame Vorkommen einzelner Antigene bei verschiedenen Mykobakterien auftreten können (MEDEIROS et al., 2010; SCHILLER et al., 2010b), wird häufig der Simultantest verwendet. Dabei werden Geflügel- und Rindertuberkulin intrakutan injiziert und zwar an zwei Injektionsstellen parallel zur Schulterlinie eines Rindes. Ein Hinweis für bTB liegt vor, wenn bei der Messung der Zunahme der Hautfaltendicke an den Injektionsstellen die des Rindertuberkulins mindestens 4 mm dicker ist als an der Injektionsstelle des aviären Tuberkulins oder klinisch sichtbare Veränderungen, wie oben beschrieben, feststellbar sind (PUCKEN et al., 2015). Der Simultantest wird mit einer Sensitivität von 55,1 - 93,5 % und mit einer Spezifität von 88,8 - 100 % angegeben (SCHILLER et al., 2010b).

Insgesamt ist eine exakte Durchführung für das Ergebnis des Intrakutan-Tests unerlässlich. Dazu gehört unter anderem, dass die Hautdicke vor und nach der Injektion von derselben Person gemessen wird und die korrekte intrakutane Injektion mittels Palpation überprüft wird (OIE, 2009).

Allerdings kann das Ergebnis des Tuberkulintests durch andere Faktoren beeinflusst werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Effektivität des Simultantestes negativ beeinflusst wird, wenn die untersuchten Rinder zusätzlich mit dem Leberegel *Fasciola hepatica* infiziert sind. Bei diesen fiel auf, dass sie im Simultantest eine schwächere Reaktion zeigten als Tiere, die nur mit *M. bovis* infiziert waren (CLARIDGE et al., 2012).

10.2.2 Interferon-Gamma-(IFN- γ -) Test

Dieser *in vitro* Test wurde in den späten 1980er Jahren entwickelt (WOOD & JONES, 2001) und wird von der OIE seit 1996 als zusätzlicher Test zum Tuberkulin-Hauttest empfohlen (OIE, 2009). Die meisten der Rinder-bTB-Kontrollprogramme basieren auf der Verwendung vom BOVIGAM[®] TB KIT der

Firma ThermoFisher (früher Prionics) als Paralleltest zum Tuberkulin-Hauttest um die Detektion infizierter Rinder zu maximieren (BEZOS et al., 2014). Der Test wurde von der Europäischen Union im Jahr 2002 als zusätzlicher Test zum Tuberkulin-Hauttest akzeptiert (Richtlinie 64/432/EWG, geändert durch (EG) 1226/2002).

Beim IFN- γ -Test wird das von T-Lymphozyten sezernierte IFN- γ gemessen, welches nur sezerniert wird, wenn die T-Lymphozyten durch einen zuvor stattgefundenen Kontakt mit Tuberkuloseerregern sensibilisiert wurden. Damit eine messbare IFN- γ -Ausschüttung erfolgt, wird in einem ersten Schritt heparinisiertes Vollblut mit spezifischen bakteriellen Antigenen (PPD-Tuberkulin) in vitro für 16 - 24 Stunden stimuliert. Nach der Stimulation wird im zweiten Schritt die Menge des freigesetzten IFN- γ mittels sandwich-ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) im Plasma gemessen (WOOD et al., 1990; OIE, 2009). Basierend auf den resultierenden optischen Dichten (OD) wird ein positives Ergebnis des Testes nach Stimulation mit Rinder-PPD (PPDb), aviärem PPD (PPDa) und PBS (Nil) vom Hersteller wie folgt definiert: $PPDb_{OD} - Nil_{OD} \geq 0,1$ und $PPDb_{OD} - PPDa_{OD} \geq 0,1$ (BEZOS et al., 2014). Eine Übersicht über die verschiedenen Cut-Off-Kriterien für den IFN- γ -Test in der Europäischen Union wurde im Jahr 2012 von der EFSA veröffentlicht (HEALTH & WELFARE, 2012). Ein Ergebnis liegt innerhalb von 24 - 48 Stunden vor (ROTHEL et al., 1990).

Zur Diagnose der Tuberkulose in der Humanmedizin ist ein vergleichbarer IFN- γ -Test kommerziell erhältlich (QuantiFERON-TB[®] Gold In-Tube, Firma Cellestis) (DIEL et al., 2011).

Die Sensitivität in Bezug auf die Erkennung der Früherkrankung einer bovinen Tuberkulose wird für den IFN- γ -Test als höher eingestuft, als für den Intrakutan-Test (GORMLEY et al., 2006; BEZOS et al., 2010). Wird der IFN- γ -Test mit dem Intrakutan-Monotest kombiniert, wird eine Sensitivität von 95,2 % beschrieben (GORMLEY et al., 2006).

10.2.3 Antikörper-Nachweis

Obwohl serologische Tests generell nicht die erste Wahl zur Diagnose der bovinen Tuberkulose darstellen, beschreiben viele Forscher Strategien zu ihrer Verwendung (RAMOS et al., 2015). Die indirekte ELISA Technik misst die

Bindung spezifischer Antikörper an ein bestimmtes Antigen (DE LA RUADOMENECH et al., 2006). Der erste ELISA dazu wurde erstmals im Jahr 1984 von Thoen und Mitarbeitern beschrieben (THOEN et al., 1984). Der Vorteil eines solchen Testverfahrens liegt in seiner Einfachheit in der Durchführung, der Nachteil in seiner mangelnden Sensitivität, die durch die erst spät einsetzende, individuelle und unregelmäßige Antikörper-Entwicklung entsteht. Um die mit *M. bovis*-infizierten Rinder mittels Antikörper-ELISA zu diagnostizieren, werden üblicherweise Antigene wie PPD und einzelne oder assoziierte gereinigte Antigene von *M. bovis* verwendet, darunter die Antigene Ag85, MPB70 und MPB83. Die meisten dieser Antigene erreichen eine Sensitivität und Spezifität von um die 90 % und sie werden bei Tieren in der anergistischen Phase und für Tiere in fortgeschrittenen Infektionsstadien empfohlen (siehe Abbildung 10) (MCNAIR et al., 2001; WELSH et al., 2005; FAYE et al., 2011). Vor kurzem wurde ein Lateral-Flow-Test entwickelt, der auf der Detektion mehrerer Antigene basiert und vielversprechende Ergebnisse in der Tuberkulosedagnostik für bestimmte Tierspezies (z. B. Elefanten) liefert. Bei anderen Spezies, wie z. B. bei Büffeln, wurden jedoch noch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt (GREENWALD et al., 2009; MICHEL & SIMÕES, 2009).

10.3 Direkter Erregernachweis

10.3.1 Mikroskopischer Nachweis

Mit der mikroskopischen Untersuchung können säurefeste Stäbchen schnell und einfach nachgewiesen werden (NEUMEISTER et al., 1992). Dafür werden die Mykobakterien meistens mit der Ziehl-Neelsen (COOK, 1997) oder bei der Fluoreszenzmikroskopie mittels Auramin-Färbung (NEUMEISTER et al., 1992) angefärbt.

Die Ziehl-Neelsen-Färbung ist zwar einfach und schnell in der Durchführung, jedoch wird ihre Sensitivität als eher gering eingestuft (WATRELOT-VIRIEUX et al., 2006; VARELLO et al., 2008). Auch eine Differenzierung der Mykobakterien-Spezies ist mittels Mikroskopie nicht möglich (NEUMEISTER et al., 1992).

Bei Verwendung der Auramin-Färbung und Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop zeigen Mykobakterien in der Auramin-Rhodamin-Färbung eine gelblich-rötliche Fluoreszenz (HOLANI et al., 2014).

10.3.2 Kultureller Nachweis

Auch in jüngerer Zeit stellt der kulturelle Nachweis von Mykobakterien den Goldstandard in der Tuberkulosedagnostik dar. Bei Anwendung in Geweben mit „visible lesions“ können hohe Detektionsraten von 95 - 96 % festgestellt werden, bei Anwendung in Geweben mit „non visible lesions“ jedoch nur von 5 - 6 % (VORDERMEIER et al., 2008). Weitere Schwächen dieses diagnostischen Verfahrens sind mögliche falsch-negative Ergebnisse bei nicht mehr vermehrungsfähigen Erregern im Untersuchungsmaterial und der hohe Zeitaufwand aufgrund des nur sehr langsamen Wachstums von pathogenen Mykobakterien (WARDS et al., 1995; CARDOSO et al., 2009). Daher kann es beim kulturellen Nachweis zu falsch-negativen Ergebnissen kommen und sie gilt somit nur im positiven Fall als beweisend (LIÉBANA et al., 1995). Generell wachsen Mykobakterien schneller in Flüssig-, als auf Festmedien, die Kontaminationsrate in Flüssigmedien ist jedoch höher. Die Kombination von Fest- und Flüssigmedien stellt daher das Mittel der Wahl dar (NEUMEISTER et al., 1992). Um das Risiko einer Kontaminationen der Nährmedien bei langer Inkubationsdauer durch die im Probenmaterial enthaltene, schneller wachsende Begleitkeimflora zu reduzieren, wird das Untersuchungsmaterial zuvor mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH dekontaminiert. Offiziell empfohlene Nährmedien durch das Nationale Referenzlabor für Tuberkulose sind zum einen die Festnährböden Stonebrink und Löwenstein-Jensen und zum anderen die Flüssignährböden Middlebrook und Kirchner (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015).

10.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein weiteres diagnostisches Mittel zum Nachweis einer mykobakteriellen Infektion ist in der Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes verankert, und zwar der molekularbiologische Nachweis von MTC-DNA aus Gewebeproben des bTB-verdächtigen Rindes (RINDTB-VO, 2014). Die in Deutschland verwendete Methode ist in der Amtlichen Methodensammlung des FLI beschrieben und dient dem schnellen MTC-Erregernachweis direkt aus dem Untersuchungsmaterial. Da diese Methode die einzig zugelassene molekularbiologische Methode durch das Nationale Referenzlabor für Tuberkulose in Deutschland ist, wird im Folgenden speziell auf diese eingegangen.

10.3.3.1 DNA Extraktion

Abhängig vom verwendeten DNA Extraktionskit werden Gewebemengen zwischen 20 und 40 mg für die Extraktion verwendet, wobei eine Überladung der Extraktionssäulen vermieden werden sollte. Zuvor sollte etwa ein Gramm Gewebe in 10 ml Puffer suspendiert werden, um aus einem größeren Gewebe-Pool die Wahrscheinlichkeit für die Verwendung erregerehaltigen Gewebes für die Extraktion zu erhöhen. Aus diesem Pool werden je nach Kit 200 - 400 µl von der Suspension entnommen und danach mittels Zentrifugation ein Pellet hergestellt. Das Pellet wird dann mit dem initialen Puffer des Extraktionskittes resuspendiert und die Extraktion nach Anweisung des Herstellers fortgeführt (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015).

Kritische Punkte bei der DNA-Extraktion sind einerseits die inhomogene Verteilung der Mykobakterien im Gewebe und die damit verbundene niedrige MTC-Detektionswahrscheinlichkeit bei einer Zufallsauswahl des Gewebematerials, vor allem beim Fehlen von sichtbaren Läsionen (STEWART et al., 2013) und die Effizienz der verwendeten Extraktionsmethode im Hinblick auf die bakterielle Zellwandlysis, da Mykobakterien durch ihren besonderen Zellwandaufbau und insbesondere ihre Peptidoglykanschicht relativ resistent gegenüber einigen Lysis-Puffern sind und sich somit ein Freisetzen der DNA aus diesen Bakterien als schwierig erweist (BOSE et al., 1993; HOSEK et al., 2006).

Die Effizienz der Bakterien-Lyse konnte schon durch alternative oder zusätzliche mechanische, enzymatische und thermische Verfahren verbessert werden (HURLEY et al., 1987; BOSE et al., 1993; ODUMERU et al., 2001), ist allerdings noch nicht optimiert. Auch das Problem der niedrigen Detektionsrate in Geweben ohne sichtbare Läsionen konnte noch nicht ausreichend gelöst werden (STEWART et al., 2013).

10.3.3.2 Real-time PCR

In Deutschland wird zum MTC-DNA Nachweis eine Duplex real-time PCR verwendet (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015). Dabei werden zwei spezifische Genorte aus den MTC-Mitgliedern vervielfältigt: eine Fragmentsequenz einer hypothetischen Helicase (HELI) (RODRIGUEZ et al., 1995) und eine Fragmentsequenz aus dem definierten Insertionselement (IS) IS 1081. IS 1081 ist noch genauer definiert und stellt ein repetitives Element im mykobakteriellen

Genom dar, das in den meisten MTC-Isolaten in sechs Kopien vorliegt (TAYLOR et al., 2007b). Zusätzlich zu den beiden Genorten muss Beta-Aktin (β -Aktin) aus dem Rindergewebe nachgewiesen werden, das als interne Kontrolle für eine erfolgreiche DNA-Extraktion in der PCR dient (TOUSSAINT et al., 2007).

Ein Ergebnis gilt als positiv, wenn beide Genorte und β -Aktin mittels Duplex real-time PCR nachgewiesen werden können. Das Ergebnis ist als zweifelhaft einzustufen, wenn nur ein Genort und β -Aktin nachgewiesen werden. Keine Signale in den beiden MTC-Genorten und positive Signale von β -Aktin sind als bTB-negativ zu bewerten (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015). Für diese Art des diagnostischen Nachweises werden eine Sensitivität von 73 % und eine Spezifität von 100 % angegeben (KÖHLER et al., 2010).

11 Magnetische Separation als Nachweisverfahren

11.1 Prinzip der magnetischen Separation

Magnetische Trenntechniken (engl.: magnetic capture, MC) werden immer häufiger für die Reinigung oder Quantifizierung biologischer Moleküle eingesetzt (HOWE et al., 1999). Sowohl in der biochemischen (LEE et al., 2006), biomedizinischen (PANKHURST et al., 2003) als auch in der molekularbiologischen Forschung (OLSVIK et al., 1994) werden magnetische Partikel zur Trennung von spezifischen Molekülen in einer Flüssigkeit verwendet.

Bei dieser Technik werden magnetische Teilchen in einer Flüssigkeit suspendiert, die die nachzuweisenden Moleküle in reiner oder verdünnter Form enthält. Die nachzuweisenden Moleküle können dann von den magnetischen Teilchen durch spezifische oder unspezifische Bindungen festgehalten oder „gefangen“ werden. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes an das Gefäß, das die zu untersuchende Flüssigkeit enthält, wandern die magnetischen Teilchen inklusive gebundenen Molekülen in Richtung Magnetfeld und konzentrieren sich so am Inneren der Gefäßwand. Bei noch angelegtem Magnetfeld kann dann die restliche Flüssigkeit, der Überstand, abgegossen werden oder mit einer Pipette abgezogen werden, sodass das Magnetpellet intakt an der Gefäßwand verbleibt. Zur Resuspendierung wird das Magnetfeld entfernt und das Magnetpellet mit Flüssigkeit resuspendiert. Dieser Schritt kann, beispielsweise zum weiteren Waschen, mehrmals wiederholt

werden (HOWE et al., 1999).

Magnetische Trenntechniken können manuell durchgeführt werden (MANGIAPAN et al., 1996; OPSTEEGH et al., 2010), bieten jedoch auch das Potenzial für eine Automatisierung des Verfahrens (ISAKSSON et al., 2014).

Ziele der Anwendung von magnetischen Trennverfahren sind eine effektive Eliminierung von PCR-Inhibitoren und die verbesserte Nachweisbarkeit durch Vorkonzentrierung des gesuchten Moleküls (STEWART et al., 2013).

11.2 Anforderungen an die magnetischen Partikel

Damit magnetische Partikel in einem MC-Assay eingesetzt werden können, müssen diese einige Anforderungen erfüllen. Dazu gehört, dass auf ihrer Oberfläche spezifische Moleküle wie Antikörper, Enzyme oder Oligonukleotidsequenzen gebunden werden können. Außerdem sollten die Partikel superparamagnetische Eigenschaften besitzen, was bedeutet, dass sie innerhalb eines Magnetfeldes magnetisch reagieren, aber nach Entfernen des Magnetfeldes nicht mehr magnetisch miteinander agieren, sodass sie wieder vereinzelt in der Suspension vorliegen, um ihre spezifischen Bindungsstellen zu präsentieren. Zusätzlich ist es wünschenswert, dass sie von identischer Form und Größe sind, um in einer Suspension identisch hinsichtlich ihrer Sedimentation und ihrer Kinetik bezüglich der Bindung von den anzureichernden Molekülen zu reagieren (OLSVIK et al., 1994). Die am häufigsten verwendeten Magnetkügelchen werden durch das Mischen von gleich großen, porösen Polymerkugeln mit Eisenmolekülen (Fe^{2+}) hergestellt. Nach dem Mischen wird eine zusätzliche Polymerschicht über die Kugeln gelegt, die die Poren verschließt und die Eisenmoleküle darunter festhält. Letztendlich ist auch die chemische Zusammensetzung der Partikeloberfläche von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Verwendung. Dazu wird eine inerte Oberfläche benötigt, die keine anderen biologischen Elemente bindet, als die für die MC spezifischen Bindungsmoleküle (UGELSTAD et al., 1992).

11.3 Immunomagnetische Separation

Die immunomagnetische Separation (IMS) wird für die Isolation von bestimmten eukaryotischen Zellen aus Flüssigkeiten wie z. B. Blut verwendet, ist effizient und wird häufig im medizinischen Bereich verwendet. Dafür werden für die zu isolierenden Zellen spezifische Antikörper auf ein magnetisches Teilchen gebunden. Aber auch prokaryotische Organismen und Viren können mittels IMS und spezifischen Antikörpern, die auf magnetische Teilchen gebunden werden, detektiert und angereichert werden (OLSVIK et al., 1994). Abbildung 11 zeigt verschiedene Techniken der Antikörperbindung an die Magnetpartikel um Mikroorganismen spezifisch anzureichern.

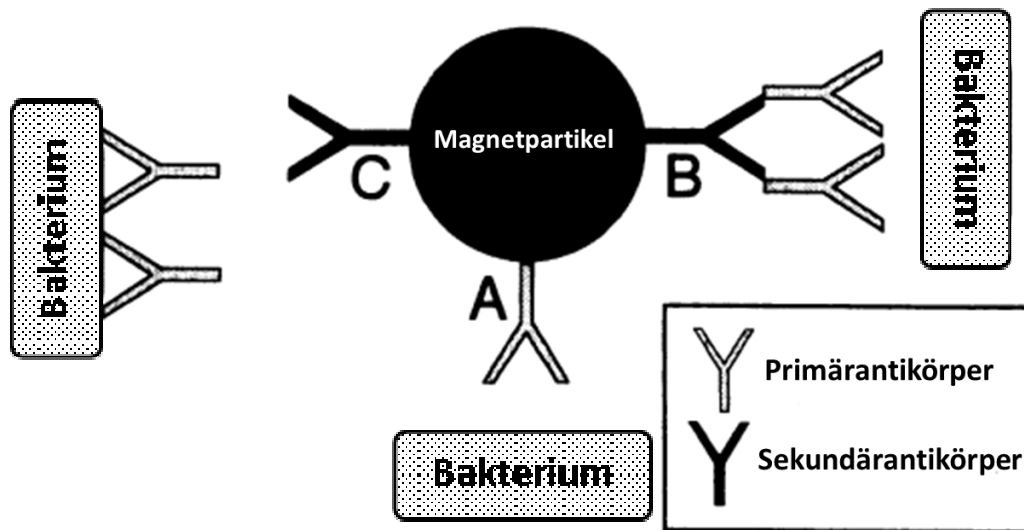


Abbildung 11: Illustration der verschiedenen Möglichkeiten um Antikörper an Magnetpartikel zu binden

- A) Der spezifische Antikörper kann direkt an die Magnetpartikel gebunden werden.
- B) Der spezifische Antikörper wird durch einen Sekundärantikörper an die Magnetpartikel gebunden.
- C) Der spezifische Antikörper bindet zuerst an das spezifische Target und wird dann durch den Sekundärantikörper an die Magnetpartikel gebunden.

Modifiziert nach Olsvik et al. (OLSVIK et al., 1994)

Auch in der Tuberkulose-Diagnostik werden bereits erfolgreich IMS-basierende Methoden verwendet, um ganze Bakterien aus Probenmaterialien herauszufiltern und sie anschließend zu kultivieren. Stewart et al. untersuchten in Irland 280 bovine Lymphknoten (206 mit „visible lesions“ und 74 mit „non visible lesions“) mittels IMS und anschließender PCR und Kultur auf das Vorkommen von *M. bovis* im Vergleich zum rein kulturellen Nachweis. Dabei konnten sie nachweisen, dass die IMS-basierenden Methoden (IMS-PCR und IMS-MGIT-Kultur) ein größeres Detektionspotenzial aufwiesen, besonders in Bezug auf Lymphknoten mit „non visible lesions“ von bTB-verdächtigen Rindern, als der Nachweis ohne Voranreicherung mittels einfacher kultureller Isolation (STEWART et al., 2013).

Auch in thailändischen Studien wurde erfolgreich ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen das mykobakterielle Antigen 85B (Ag85B) für IMS-basierende Diagnostik in humane Sputumproben verwendet (INTORASOOT et al., 2016).

11.3 Magnetische Separation von Nukleinsäuren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Nukleinsäuren mittels magnetischer Separation (engl.: magnetic capture hybridization, MCH) spezifisch anzureichern. Diese sind schematisch in Abbildung 12 dargestellt:

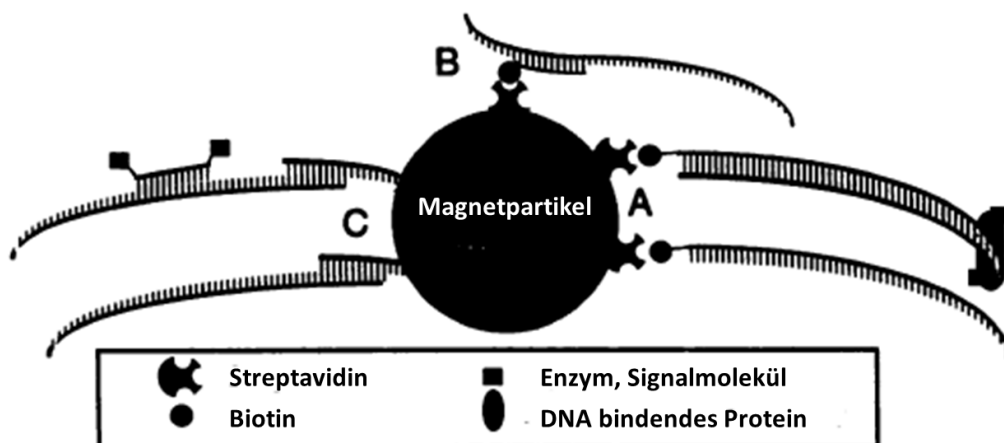


Abbildung 12: Illustration der verschiedenen Möglichkeiten um Nukleinsäuren an Magnetpartikel zu binden

Modifiziert nach Olsvik et al. (OLSVIK et al., 1994)

DNA- oder RNA-Segmente können über die Magnetic Capture isoliert und konzentriert werden, indem ein Ligand wie beispielsweise das Biotin-bindende Enzym Streptavidin an ein Magnetkügelchen gebunden und das passende Substrat (Biotin) an spezifische DNA-Sequenzen gekoppelt wird.

Durch die Verwendung von Biotin-markierten Primern in einer PCR-Reaktion können die Amplicons gereinigt, konzentriert (A) und sogar in einem direkten Assay verwendet werden. Die DNA kann auch durch Denaturierung in ihre Einzelstränge zerlegt werden und die beiden Stränge können zum Sequenzieren abgetrennt werden (A).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung einer Biotin-markierten Sonde, die verwendet werden kann, um Fragmente mit spezifischen Sequenzen zu fangen (B) (A und B: Two-Step-Methoden).

Als Dritte Möglichkeit zur magnetischen Separation von Nukleinsäuren kann DNA direkt auf der Magnetkugeloberfläche kovalent gebunden werden, um spezifische DNA-Fragmenten zu isolieren (One-Step-Methode) (C). Diese gebundene Sonde kann weiter mit einer anderen spezifischen Sonde in anderen Assays verwendet werden (OLSVIK et al., 1994; MANGIAPAN et al., 1996).

Auch die magnetische Separation von Nukleinsäuren wurde schon erfolgreich in der Diagnostik von Bakterien (OLSVIK et al., 1994; OPSTEEGH et al., 2010), Parasiten (OLSVIK et al., 1994; ISAKSSON et al., 2014) und auch in der mykobakteriellen Diagnostik (MANGIAPAN et al., 1996) angewandt.

Mangiapan et al. verwendeten die magnetische Separation von Nukleinsäuren um die Sensitivität der Detektion von mykobakterieller DNA aus klinischen Proben von Patienten mit einer pauci-bazillären Form der Tuberkulose zu steigern. So war es Ziel ihrer Studie durch die MC spezifisch die mykobakterielle DNA vor der Amplifikation via PCR anzureichern, dabei die Ziel-DNA zu konzentrieren und gleichzeitig Inhibitoren und irrelevante Wirts-DNA zu eliminieren. Damit konnte eine gesteigerte Sensitivität um das zehnfache bis 100-fache festgestellt werden und die Autoren schlussfolgerten, dass das von ihnen entwickelte Verfahren der „sequence-capture-PCR“ tatsächlich die Sensitivität der Detektion von mykobakterieller DNA aus den von ihnen verwendeten Proben erhöht. Auch legten die Ergebnisse der Studie nahe, dass die „sequence-capture-PCR“ auf eine Vielzahl von unterschiedlichen Organismen in anderen pathologischen Prozessen

angewendet werden kann (MANGIAPAN et al., 1996).

Diese Aussagen konnten auch durch neuere Studien bestätigt werden. Zu ihnen gehören beispielsweise Studien von Opsteegh et al., die das MC-Verfahren erfolgreich zur Detektion von *Toxoplasma gondii* in Fleischproben einsetzen konnten (OPSTEEGH et al., 2010). Und auch Studien von Isaksson et al. untersuchten mittels MC-PCR Kotproben von Füchsen auf das Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* und konnten dabei ebenfalls eine hohe Sensitivität und eine sehr hohe Spezifität der Verfahrens feststellen (ISAKSSON et al., 2014).

Zusammenfassend suggerierten die vorgestellten Studien mit dem Einsatz der magnetischen Separation von Nukleinsäuren vielversprechende Ergebnisse.

Daher wurde diese Technik als Two-Step-Methode in unserer Studie dazu verwendet, die in einer weitaus geringeren Menge in der Probe enthaltene MTC-DNA aus einem großen Probenvolumen mit einer großen Menge Wirts-DNA und Inhibitoren spezifisch anzureichen.

III PUBLIKATION

Fell et al. *BMC Microbiology* (2016) 16:213
DOI 10.1186/s12866-016-0816-2

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of *Mycobacterium-tuberculosis*-complex members in cattle and red deer tissue samples

Shari Fell¹, Stephanie Bröckl², Mathias Büttner², Anna Rettinger¹, Pia Zimmermann² and Reinhard K. Straubinger^{1*}

Abstract

Background: Bovine tuberculosis (bTB), which is caused by *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*, is a notifiable animal disease in Germany. Diagnostic procedure is based on a prescribed protocol that is published in the framework of German bTB legislation. In this protocol small sample volumes are used for DNA extraction followed by real-time PCR analyses. As mycobacteria tend to concentrate in granuloma and the infected tissue in early stages of infection does not necessarily show any visible lesions, it is likely that DNA extraction from only small tissue samples (20–40 mg) of a randomly chosen spot from the organ and following PCR testing may result in false negative results. In this study two DNA extraction methods were developed to process larger sample volumes to increase the detection sensitivity of mycobacterial DNA in animal tissue.

The first extraction method is based on magnetic capture, in which specific capture oligonucleotides were utilized. These nucleotides are linked to magnetic particles and capture *Mycobacterium-tuberculosis*-complex (MTC) DNA released from 10 to 15 g of tissue material. In a second approach remaining sediments from the magnetic capture protocol were further processed with a less complex extraction protocol that can be used in daily routine diagnostics. A total number of 100 tissue samples from 34 cattle ($n = 74$) and 18 red deer ($n = 26$) were analyzed with the developed protocols and results were compared to the prescribed protocol.

Results: All three extraction methods yield reliable results by the real-time PCR analysis. The use of larger sample volume led to a sensitivity increase of DNA detection which was shown by the decrease of Ct-values. Furthermore five samples which were tested negative or questionable by the official extraction protocol were detected positive by real time PCR when the alternative extraction methods were used. By calculating the kappa index, the three extraction protocols resulted in a moderate (0.52; protocol 1 vs 3) to almost perfect agreement (1.00; red deer sample testing with all protocols).

Conclusion: Both new methods yielded increased detection rates for MTC DNA detection in large sample volumes and consequently improve the official diagnostic protocol.

Keywords: Bovine tuberculosis, MTC, DNA extraction, Magnetic capture, *Mycobacterium caprae*

* Correspondence: R.Straubinger@lmu.de

¹Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 The Author(s). **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Mycobacterium bovis and *M. caprae* are the causative agents of bovine tuberculosis (bTB) and belong among others to the *Mycobacterium-tuberculosis-complex* (MTC) [1, 2]. Its members cause tuberculosis (TB) in humans and other mammalian species worldwide and therefore hold zoonotic potential [3, 4].

Bovine tuberculosis can manifest as an acute or chronic infectious disease with a long subclinical phase and with the potential of reactivation after years [5]. In general, clinical signs depend on bacterial infectious dose and virulence, but also on the state of immune competence of the host and external influences [6]. The frequency of the presence and severity of clinical signs depends also on the host species, as in some species these are usually apparent, e.g. possums [7] and guinea pigs [8]. Most cattle that are infected do not develop clinical signs. In the early phase of infection, mycobacteria are phagocytosed by resident macrophages and may be eliminated. Alternatively, macrophages and/or dendritic cells (DC) will transport mycobacteria to the draining lymph node. With participation of interleukin-producing dendritic cells, macrophages, lymphocytes, neutrophils and epitheloid cells, the host immune system forms a tuberculoid granuloma [9]. This small granuloma prevents further spread of the pathogen to surrounding tissues and it can stay arrested for a long time. Bacilli within the center of the lesion do not multiply but may remain dormant and the resulting latent infection may persist for years [10]. Immunosuppression can disturb the balance between host control and agent dissemination, allowing replication of the silenced pathogen with reactivation and spread of the infection. They may knock out the host's immune defense leading to bacteria spread to all tissues. Finally the mycobacteria will be shed via secretion/excretion and can find access to other susceptible hosts [5, 6]. However in animals, generalized manifestation is less common [11]. In contrast to the typical granuloma formation mostly in lymphoid tissue, non-visible lesions (NVL) may be present in many individuals after infection with bTB. These individuals show immune reactions in the tuberculin skin test in an early state of infection [9, 12]. Due to the localized manifestation of mycobacterial infection sometimes as only very small granuloma or tiny lesions, visual screening of carcasses after slaughter is challenging [13, 14].

Bovine tuberculosis is a notifiable animal disease in Germany. In 1996, Germany was declared "officially free of tuberculosis" (OTF) by the European Commission [15]. However, since 2008 until now, regular detection of *M. caprae* infections in cattle and red deer occurred in the Bavarian and Austrian alpine region [16, 17]. As a result, the national tuberculosis regulation was revised in 2009, 2012 and 2013 and

an improvement of the control strategy was considered necessary.

The current diagnostic protocol in the framework of the government guided animal disease control [18] offers the tuberculin skin test (ante mortem), the gamma-interferon release assay (ante mortem), the bacteriological culture (post mortem), and a highly specific molecular detection method based on a real-time PCR protocol that is specific for MTC DNA detection in animal tissue (post mortem). In the official collection of recommended methods of the Friedrich-Loeffler-Institute (FLI) in Greifswald, Germany [19], the protocol for DNA extraction and the MTC specific real-time PCR are specified.

The guidelines require that DNA extraction is performed with 11 tissue samples per animal, which has been tested as bTB suspicious or positive using the single intradermal comparative cervical tuberculin test (SICCT) or showed suspicious lesions/granulomas after slaughter. One gram of each tissue sample is homogenized and 200 to 400 µl of the homogenate used for DNA extraction. However, due to the inhomogeneous distribution of *Mycobacteria* spp. in tissue material and the problem of NVL in the early stages of infection it is obvious that the use of small sample volumes for DNA extraction may result in false negative PCR results.

The aim of this study was the development of alternative DNA extraction methods, which allow the investigation of a larger sample mass (~2–20 g) to increase the probability of MTC DNA detection in animal tissue. First, a DNA extraction method based on magnetic capture was established. Magnetic capture of DNA is a method that has been used previously for the detection of other MTC members [20] and other in tissue inhomogeneously scattered pathogens such as *Toxoplasma* spp. and eggs of *Echinococcus multilocularis* [21, 22]. In other recent studies, there are also other attempts to improve the diagnosis of infections caused by *M. bovis* on the basis of magnetic capture, not capturing specific DNA but applying an immunomagnetic method that concentrates mycobacteria with specific antibodies [23]. Secondly, we combined the lysis of a large sample volume with the less complex DNA extraction protocol from the official collection of recommended methods in order to simplify the application. As cultivation, usually the gold standard for bTB diagnostics, was not performed for each of the eleven tissue samples per animal, but only for cattle and red deer samples, which tested positive or equivocal by real-time PCR and/or showed visible lesions/granulomas, we decided to use the prescribed DNA extraction method (protocol 1) as reference method in our study. So thirdly, the results of the two newly established extraction methods were compared to the results obtained with the prescribed DNA extraction method. Comparison of all three protocols

showed that processing of larger sample volumes increased the detection rate for *M. caprae* DNA. The new extraction protocols offer robust and easy to use tissue preparations to improve access to MTC DNA in larger sample masses and consequently reduce false negative results in routine bTB diagnostics.

Methods

Animal tissue

Organ samples originated from red deer and cattle that were sent to the local Food and Health Safety Authority in Oberschleißheim for bTB diagnosis as part of the regional bTB surveillance programs (cattle) or alpine monitoring (red deer) in 2013, 2014 and 2015 [16, 17]. The tissue samples from cattle were processed the same day of collection. Tissue samples from red deer were stored at -20°C before diagnostics was initiated. DNA extraction was performed under BSL3 conditions and the heat inactivated extracts were further processed under BSL2 conditions. A total number of 100 tissue samples from 34 cattle ($n = 74$ tissue samples) and 18 red deer ($n = 26$ tissue samples; Tables 2 and 3), were examined for the presence of MTC DNA with the different DNA extraction methods and a subsequent real-time PCR.

Negative tissues samples used as controls for real-time PCR validation were collected from a bTB-negative cow slaughtered in the slaughterhouse in Munich in February 2013. This cow originated from a herd with no history of bTB infections. Organs did not show any pathological findings and DNA was extracted according to the prescribed protocol following the instructions of the official collection of recommended methods (protocol 1). Five intestinal lymph nodes, two lung lymph nodes and one retropharyngeal lymph node were chosen and confirmed negative for MTC by real-time PCR. Furthermore, pathological inconspicuous intestinal ($n = 5$) and lung ($n = 5$) lymph nodes of different weight (4.4 to 13.4 g) from five bTB-unsuspicious cattle from the slaughterhouse in Munich, collected in July 2014, were tested by DNA extraction protocol 1 and following real-time PCR and confirmed to be negative for MTC-specific DNA before they were used for the establishment of the new DNA extraction method based on magnetic capture.

Mycobacteria culture and spiking of bTB uninfected bovine lymph nodes

Mycobacterium bovis BCG (ATCC No. 27289, DMSZ Braunschweig, Germany) was cultivated in BBL Middlebrook 7H9 broth with glycerol (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) and Loewenstein-Jensen with glycerin and PACT (Merck, Darmstadt, Germany) for 6 to 8 weeks at 37°C in the New Brunswick Galaxy 170 R incubator (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and confirmed as *M. bovis* BCG by the commercial Test

Kit GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) following the manufacturer's instructions. To establish the magnetic capture protocol, the MTC-negative lymph nodes ($n = 10$) were artificially spiked with five injections per lymph node each containing 100 μl of a *M. bovis* BCG suspension to mimic the inhomogeneous distribution of *Mycobacteria* spp. in animal tissue. The suspension was created using 1 ml phosphate buffered saline (PBS, according to Moore, 2001) and one loop of colony material from *M. bovis* BCG. Two samples of 1 g each from randomly chosen spots of ten spiked lymph nodes (20 samples in total) were processed according to the original DNA extraction protocol (protocol 1). Remaining tissue of the spiked lymph nodes was further processed separately according to the magnetic capture method (protocol 2).

DNA extraction protocols

Protocol 1: standard mycobacterial DNA extraction from animal tissue according to the prescribed protocol of the official collection of recommended methods

With diagnostic samples of unknown microbial content, DNA extraction was executed with the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol "Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)" with the following modifications to suit the specific need for DNA extraction in the case of *Mycobacteria* spp. To increase the probability to detect MTC DNA in animal tissue, 1 g of each tissue sample was homogenized with 10 ml PBS. From the tissue suspension 200 to 400 μl were transferred to a 1.5-ml tube and centrifuged for 10 min at $10,000 \times g$ (Eppendorf centrifuge 5430, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The pellet was resuspended in 180 μl tissue lysis buffer (ATL buffer) and 20 μl proteinase K (20 mg/ml). Additionally, lysis time was increased to an overnight incubation. The next day, the tissue digest was heated for 20 min at 99°C to inactivate proteinase K and potentially infectious material. After cooling to room temperature, 200 μl buffer AL were added. After centrifugation with buffer AW2 at $20,500 \times g$ for 3 min, a DNeasy Mini spin column was placed into a 2-ml collection tube and centrifuged for an additional 1 min at $6800 \times g$ to dry the DNeasy membrane completely. Eluted DNA was stored at -20°C until real-time PCR was performed.

Protocol 2: magnetic capture assay

Tissue lysis and homogenization Each diagnostic sample was weighed, cut into small pieces with a sterile surgical disposable scalpel (Braun, Aesculap AG, Tuttlingen, Germany), and put into a 50-ml screw cap tube (SuperClear, VWR International, Radnor, Pennsylvania), containing

20 of $\frac{1}{4}$ " ceramic sphere beads (MP Biomedicals, Illkirch, France). The bovine tissue samples had an average weight of 5.3 g within a range of a minimum of 2 g to a maximum of 16 g. The tissue samples from red deer had an average weight of 5.1 g within a range of a minimum of 2 g to a maximum of 16 g. Depending on the weight on the sample, a defined volume of tissue lysis buffer (ATL buffer, Qiagen, Hilden, Germany) relative to the sample weight and proteinase K (20 mg/ml, Qiagen, Hilden, Germany) were added to the tube (volumes of buffers are shown in the Additional file 1: Table S1). Disruption and homogenization of the tissue samples to solubilize mycobacterial DNA were done using the FastPrep 96 homogenizer (MP Biomedicals, Solon, Ohio) equipped with the BIGFLEX 8 × 50 ml adapter. Samples were homogenized for 90 s with maximum speed at 1800 rpm. Then, tubes were placed in the Thermomixer C (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) equipped with the Eppendorf SmartBlock 50-ml adapter and incubated overnight at 56 °C and 450 rpm. To inactivate proteinase K and potentially infectious bacteria, tubes were incubated twice at 99 °C and 450 rpm for 15 min with a short centrifugation step in between to spin down the material. After cooling down to room temperature, tissue digests were transferred into a new 50-ml screw cap tube (SuperClear, VWR International, Radnor, Pennsylvania). Tubes containing the pellet of used ceramic sphere beads were discarded. Samples were centrifuged (Eppendorf centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 30 min at 5000 × g to spin down coarse materials. Supernatants (crude extract) were divided and placed into two 15-ml screw cap tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) for better handling. Subsequently, both 15-ml screw cap tubes were handled equally. Pellets were resuspended in 2 ml of distilled water and stored at -20 °C ($n = 49$).

Free biotin removal To eliminate naturally occurring biotin from the sample high performance Streptavidin sepharose (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) with a binding capacity of > 300 nmol/ml was used. Before use, a defined volume of the enzyme was washed three times (Additional file 1: Table S1). For that purpose, 1 ml of PBS was added to the enzyme and after mixing thoroughly the mixture spun down at 20,000 × g (Eppendorf centrifuge 5424) for 2 min. This process was repeated twice and thereafter the streptavidin sepharose was resuspended in the initial volume. The washed enzyme was added to the crude extract. Tubes were placed on a shaker (ST 5, CAT, M. Zipperer GmbH, Stauf, Germany) and incubated at room temperature for 30 min and 40 rpm to allow for streptavidin-biotin binding before centrifugation at 5000 × g for 10 min to remove the

sepharose. Up to 10 ml of each supernatant were transferred into clean 15-ml tubes.

Hybridization of the biotinylated capture probe For sequence-specific DNA capturing, 10 µl of each capture oligonucleotide (Cap1 to 4; 1 pmol/µl) were added to each supernatant. Sequences of these capture oligonucleotides are shown in Table 1. The solutions were heated at 95 °C for 15 min in the Thermomixer C (Eppendorf AG) equipped with the Eppendorf SmartBlock 15-ml adapter to denature the target DNA, followed by an incubation at 55 °C for 30 min and 300 rpm to allow hybridization between capture-oligonucleotide and MTC-DNA. Tubes were left to cool down to room temperature for 15 min on the shaker at 40 rpm.

Capturing the target DNA Per 15 ml tube 80 µl of M-270 Streptavidin Dynabeads (Invitrogen by Life technologies AS, Oslo, Norway, 10 mg/ml, 2.8 µm, binding capacity 650–1350 pmoles/mg beads) were washed three times in 1 ml binding and washing (B&W) buffer (5 mM Tris HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA pH 8.0, 1.0 M NaCl) according to the manufacturer's instruction in a 2-ml tube. The beads were pelletized in a Dynal MPC-S magnet (Invitrogen by Life technologies AS) between the washing steps and resuspended in the initial volume of B&W buffer. The washed beads and defined volumes of 5 M NaCl (Additional file 1: Table S1) were added to each supernatant and the supernatants were incubated at room temperature for 60 min on the shaker at 40 rpm.

Washing of magnetic beads The resultant complex of streptavidin bead and biotin labelled capture-oligonucleotide with potentially hybridized MTC DNA was isolated using the Dynal MPC-1 magnet (Invitrogen by Life technologies AS). For this purpose the two 15-ml tubes containing supernatants of the same tissue sample were placed in a MPC-1 magnet for 10 min. Then, supernatants were removed with a disposable Pasteur pipette (230 mm, Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany). The tubes were removed from the magnet and remaining beads on the inner tube wall were washed down with 5 ml of B&W buffer and transferred into new 5-ml tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Magnetic bead isolation (5 min) and the following wash step were repeated in 5-ml and 1.5-ml tubes using 5 ml and 1 ml B&W buffer. Remaining beads were finally resuspended in 100 µl of distilled water. The bead suspension was heated to 100 °C for 10 min to release MTC DNA into solution. The tubes were then placed in the MPC-S magnet and resulting supernatants were immediately transferred to one clean 1.5-ml tube. Beads were discarded and supernatants were stored at -20 °C for real-time PCR analysis.

Table 1 Oligonucleotide sequences of capture-oligonucleotides, real-time PCR primers and probes

No.		Name	Sequence 5'-3'	5'-label	3'-label
1	oligonucleotides for capturing MTC DNA: Cap 1 and Cap 2 are specific for Heli; Cap 3 and Cap 4 are specific for IS 1081	Cap 1	TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG	Biotin	TEG
		Cap 2	TCA CCA CCG ACA AAG CGT C	Biotin	TEG
		Cap 3	CTC TCG ACG TTC ATC GCC G	Biotin	TEG
		Cap 4	TGG CGG TAG CCG TTG CGC	Biotin	TEG
2	duplex real-time PCR specific for the hypothetical Helicase (Heli)	MTC-Heli 4 F	TTG ATC AGG TCG ACG ATG TAG		
		MTC Heli 4R	TCA CCA CCG ACA AAG CGT C		
		MTC Heli 4 FAM	TCA ACG ACC CCA ACG ACT GGT GC	FAM	BHQ1
3	duplex real-time PCR specific for the insertion sequence 1081 (IS 1081)	MTC IS 1081 5 F	CTC TCG ACG TTC ATC GCC G		
		MTC IS 1081 5R	TGG CGG TAG CCG TTG CGC		
		MTC IS 1081 5 FAM	ATT GGA CCG CTC ATC GCT GCG TTC	FAM	BHQ1
4	Duplex real-time PCR specific for β -actin	ACT2 1030 F	AGC GCA AGT ACT CCG TGT G		
		ACT 1135 R	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T		
		ACT-1081 1105 Y	TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATGT	YakimaYellow	BHQ1

Primer and Probes, no. 2, 3 and 4 according to the Official Collection of Methods [19]

Protocol 3: DNA extraction from the sediments

Sediment suspensions produced as byproducts of the magnetic capture protocol (see "Protocol 2: magnetic capture assay, Tissue lysis and homogenization") of 49 tissue samples were treated according to protocol 3. For this purpose, these sediments were thawed. Aliquots of 200 μ l were subjected to DNA extraction by adding 200 μ l AL-Buffer. The remaining steps of DNA extraction were performed as outlined in protocol 1.

Measurement of DNA quality and quantity

As all samples from cattle and red deer had been processed in daily routine diagnostics, it is not possible to provide further information regarding DNA quantity and quality generated with protocol 1. All samples generated with protocol 2 and protocol 3 were checked for DNA content and quality in duplicate with the Eppendorf Biophotometer D30 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and average values were calculated.

Duplex real-time PCR according to the official collection of recommended methods

Briefly, two different target sequences were used to prove the presence of MTC DNA in the sample namely a hypothetical helicase (Heli) and an insertion element (IS) 1081. As internal control system for a successful DNA extraction, amplification of genomic DNA of the beta-actin (β -actin) gene (tissue) was integrated in both PCRs. An overview of primers and probes used for amplification are shown in Table 1. Internal controls for real-time PCR validation were prepared as follows.

As positive FAM control, DNA extracted according to protocol 1 from a pure culture of *M. bovis* BCG (positive control), and as positive HEX control, DNA from bTB-free lymph nodes (EC, tested negative by our reference

method, protocol 1) were also implemented into the detection protocol. Water (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was used as negative control.

Each DNA sample was evaluated in triplicates. The average of triplicate Ct-values was used for data interpretation. For each of the three primer-probe combinations, a primer-probe mix according to the official collection of recommended methods for better handling was designed (Heli and IS 1081: 10 pmol primer/ μ l + 1.25 pmol probe/ μ l; β -actin: 2.5 pmol primer/ μ l + 1.25 pmol probe/ μ l). Twenty-five microliters reaction mixture consisted of 3.5 μ l PCR water (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), 12.5 μ l of 2X QuantiTect Multiplex Master Mix (QuantiTect Multiplex PCR Kit no ROX, Qiagen, Hilden, Germany), 2.0 μ l of primer-probe mix β -actin, 2.0 μ l of primer-probe mix either Heli or IS 1081, and 5.0 μ l of template undiluted DNA. PCR amplification was performed in 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) using a Stratagene Mx3005P thermal cycler instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, California) with following cycling conditions: initial incubation step at 95 °C for 15 min to activate the DNA polymerase, followed by 45 amplification cycles that consisted of a denaturation step at 95 °C for 1 min, an annealing step at 60 °C for 30 s, and an extension step at 72 °C for 30 s. Fluorescence signals were collected in the annealing phase and were detected via the FAM and the HEX channel.

Interpretation of real-time PCR results

All tissue samples and the positive control were required to produce β -actin signals with a threshold cycle (Ct) of more than 21 in the HEX channel. If no signals (no Ct-value) were detected in the HEX channel (tissue DNA) and also in the FAM channel (MTC DNA), the real-time PCR was not evaluable. Hence, DNA isolation and/or

PCR were repeated. Since negative control and positive control extracts did not contain tissue DNA, no Ct-values were expected in the HEX channel.

The MTC-specific target sequences Heli and IS 1081 were considered positive below a Ct-value of 39.00, calculated as the mean of a triplicate. If only one of the two target genes produced a sufficient signal, the sample was considered equivocal. If no Ct-value was generated, samples were interpreted as negative.

Mycobacterial cultivation of field samples and characterization

All red deer and cattle that were tested MTC-positive or equivocal by real-time PCR after DNA extraction protocol 1 were further processed by culture under BSL3 conditions at the Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, as described by Rettinger et al. [17]. As mentioned earlier, not all 11 tissue samples per animal were cultivated, but only samples with visible lesions/granulomas and all the tissue samples tested positive and equivocal by real-time PCR were chosen for further investigation. Single colonies of the culture material were used for species identification using GenoType MTBC (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany).

Microscopic examination of the sediments

Acid fastness/Ziehl-Neelsen staining technique

To proof whether mycobacteria can be found in the homogenized and inactivated sediments, Ziehl-Neelsen staining was carried out on four sediments, which were thawed from -20°C to room temperature. Sediments were chosen according to their Ct-value for MTC-DNA. One retropharyngeal lymph node from cattle and one retropharyngeal lymph node from red deer were selected as positive organs (animal no. 18, Table 2 and no. 17, Table 3). Samples from animal no. 7 and no. 22 (Table 2) were used as negative samples. Ten microliters of sediment were spread with a sterile pipette tip on a microscope slide (Henry Schein, Melville, New York, USA). The preparation was air-dried, fixed by heat, stained with carbol fuchsin solution (Merck, Darmstadt, Germany) and allowed to stand for 5 min. The stained smear was washed with distilled water and decolorized with hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany) in ethanol for up to 30 s. The preparation was washed again with distilled water and counterstained with malachite green (oxalate) solution (Merck, Darmstadt, Germany) for 1 min. Additional rinsing was done with distilled water to remove excess color and the slide was allowed to air-dry. Slides were screened at 1,000X magnification (oil emersion objective) in a microscope (Leica DM5000B, Leica CTR5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Acid fast bacilli appeared in red, tissue material in blue. A red, straight or

slightly curved rod occurring singly or in a cluster indicated the presence of acid fast tubercle bacilli.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using MedCalc statistical software ver. 16.4.3 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium). The agreement level between the overall results per animal for the three extraction protocols was assessed using the kappa (κ) index and interpreted as follows: < 0.00 poor, $0.0-0.20$ slight, $0.21-0.40$ fair, $0.41-0.60$ moderate, $0.61-0.80$ substantial, $0.81-1.00$ almost perfect agreement [24]. Protocol 1 was used as reference method and the results of protocol 2 and 3 were compared each to protocol 1 and to each other. Unevaluable results were not included in the calculation.

Results

M. bovis BCG cultivation and real-time PCR validation

M. bovis BCG, which was used as positive control for real-time PCR validation, grew to sufficient quantity after 5 weeks of incubation. Culture material was used for DNA extraction (protocol 1) and implemented as positive control showing average Ct-values of $\text{Ct}_{\text{Heli}} = 18.30$ (β -actin + Heli) and $\text{Ct}_{\text{IS 1081}} = 17.53$ (β -actin + IS 1081). There were no signals for β -actin.

The MTC-negative lymph nodes used as extraction and HEX positive/FAM negative control were extracted in accordance to protocol 1. None of the used lymph nodes showed amplification results for Heli or IS 1081, but β -actin averaged at $\text{Ct}_{\beta\text{-Actin}} = 19.42$ (β -actin + Heli) and $\text{Ct}_{\beta\text{-Actin}} = 18.84$ (β -actin + IS 1081).

Establishing the magnetic capture protocol by utilizing artificially spiked lymph nodes

Twenty samples were processed according to protocol 1 and tested negative for MTC DNA (average $\text{Ct}_{\beta\text{-actin}} = 22.65$) and only eight samples were MTC-positive (average $\text{Ct}_{\beta\text{-actin}} = 22.89$, $\text{Ct}_{\text{Heli}} = 34.32$, and $\text{Ct}_{\text{IS 1081}} = 35.02$). When protocol 2 was applied, all spiked lymph nodes ($n = 10$) turned out to be MTC-positive (100 %) and produced reliable amplification signals for MTC DNA (average $\text{Ct}_{\text{Heli}} = 31.90$, average $\text{Ct}_{\text{IS 1081}} = 30.03$). However, compared to protocol 1 less β -actin was detected (average $\text{Ct}_{\beta\text{-actin}} = 28.65$). Considering the fact that protocol 2 aimed specifically at MTC DNA and neglected host-specific genes, which were removed with the supernatants, no better Ct-values for β -actin were expected.

Evaluation of field samples processed according to protocols 1 to 3

All 100 tissue samples processed according to protocol 1 produced evaluable real-time PCR results and each tissue sample could consequently be classified as positive

Table 2 Ct-values of the three DNA extraction protocols of the MTC-specific target genes Heli and IS 1081 generated with the field tissue samples of cattle

Animal No.	Tissue	Weight in grams	Protocol 1		Protocol 2		Protocol 3		Protocol 1 Overall result	Protocol 2 per animal	Protocol 3
			Heli	IS 1081	Heli	IS 1081	Heli	IS 1081			
1	Lung	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	–
	Diaphragm	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–			
2	Lung	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	–
3	Intestinal In	3	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	negative
	Kidney	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
	Kidney In	2	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
4	Intestinal In	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	negative
	Liver	4	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
5	Ln cervicalis superf.	8	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative
	Mediastinal In	10	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
	Kidney	7	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–			
	Kidney In	4	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–			
6	Liver	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	negative
	Lung	2	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
	Kidney	4	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–			
7	Lung ^a	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	–
8	Lung In	6	27.20	26.96	31.60	32.50	–	–	positive	positive	–
9	Retropharyngeal In	3	37.99	37.58	36.93	37.64	–	–	positive	positive	–
10	Intestinal In	4	31.10	30.54	28.87	29.32	31.85	32.08	positive	positive	positive
11	Liver In	4	43.92	37.32	35.59	35.00	37.54	39.29	positive	positive	positive
	Lung	2	34.26	31.18	37.77	39.37	37.56	38.68			
12	Intestinal In	5	28.21	26.69	31.10	31.50	–	–	positive	positive	–
13	Intestinal In	6	29.23	28.02	38.42	39.25	35.53	35.65	positive	equivocal	positive
14	Intestinal In	4	no ct	no ct	33.90	33.92	33.97	34.20	negative	positive	positive
15	Diaphragm	10	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative
	Diaphragm	10	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
	Diaphragm	3	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–			
16	Intestinal In	3	35.31	35.60	no ct	no ct	33.41	34.74	positive	positive	positive
	Lung	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
	Lung In	3	29.71	30.38	30.45	31.05	30.56	30.90			
	Spleen	6	no ct	no ct	no ct	no ct	41.09	37.00			
	Kidney	8	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct			
17	Intestinal In	3	34.31	34.36	32.00	32.20	–	–	positive	positive	–
18	Liver	4	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	positive	positive	positive
	Lung ^a	5	26.53	27.10	24.80	24.86	26.28	26.73			
	Mediastinal In	8	30.22	30.40	32.66	33.19	32.57	32.82			
	Spleen	5	no ct	no ct	34.50	35.70	–	–			
	Kidney	3	no ct	no ct	38.80	38.20	–	–			
	Retropharyngeal In	2	no ct	no ct	ne	ne	–	–			
19	Mediastinal In	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative
20	Intestinal In	5	32.95	32.87	33.80	34.40	–	–	positive	positive	–
	Mediastinal In	5	35.88	36.29	38.70	40.90	–	–			

Table 2 Ct-values of the three DNA extraction protocols of the MTC-specific target genes Heli and IS 1081 generated with the field tissue samples of cattle (Continued)

	Retropharyngeal In	4	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
21	Lung In	4	no ct	no ct	29.29	30.08	31.59	31.43	negative	positive	positive	
22	Intestinal In	8	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative	
	Liver	6	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct				
	Lung	6	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Lung In	9	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Spleen	6	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Kidney	9	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Retropharyngeal In ^a	5	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct				
23	Kidney	2	no ct	no ct	ne	ne	ne	ne	negative	positive	equivocal	
	Muscle	9	no ct	no ct	37.60	37.72	38.65	40.23				
	Palatine tonsil	3	no ct	no ct	39.57	41.83	39.17	39.14				
24	Udder In	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative	
25	Intestinal In	2	no ct	no ct	32.92	34.22	31.61	31.05	negative	positive	positive	
26	Lung In	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	negative	
	Rumen	5	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct				
27	Lung	6	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	negative	
	Thymus	16	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct				
28	Lung	6	no ct	no ct	39.00	no ct	–	–	negative	negative	–	
29	Pelvic In	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	positive	positive	
	Mesentery	8	no ct	no ct	36.32	36.63	37.46	38.95				
	Kidney	6	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Peritoneum	11	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct				
30	Intestinal In	3	no ct	no ct	34.14	34.49	38.22	38.39	negative	positive	positive	
	Liver In	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Lung In	6	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
	Retropharyngeal In	7	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
31	Kidney	5	no ct	no ct	no ct	no ct			negative	negative	–	
32	Lung	5	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative	
	Lung In	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–				
33	Lung In	6	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	–	
34	Spleen	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative	

In lymph node, ne not evaluable

– not done

^amicroscopic examination of Ziehl-Neelsen-stained sediments

for MTC-specific DNA, negative or equivocal. Also the remaining tissue materials from cattle and red deer ($n = 100$), which were further processed according to protocol 2 ($n = 100$) and protocol 3 ($n = 49$) produced reliable signals in the applied real-time PCRs in relation to all DNA extraction protocols. Six of the 100 organ samples extracted with protocol 2 showed inhibition in the real-time PCR and generated no signals neither for β -actin nor for Heli or IS 1081 and were therefore excluded from statistical analysis. From all other samples signals were detected even if the samples were previously stored at -20°C .

DNA extraction according to protocol 1 – MTC results

Results of protocol 1, which had been generated at the local Food and Health Safety Authority, were used as the reference method and as basic values for the comparison to the protocols 2 and 3. Efficiencies of the established DNA extraction protocols were determined by comparing their values to those generated with Protocol 1. Therefore, the decrease of Ct-values was regarded as an improvement for sensitivity for the different extraction methods. In protocol 1, 81.1 % of all bovine tissue samples ($n = 74$) were tested MTC negative ($n = 60$), 1.4 %

Table 3 Ct-values of the three DNA extraction protocols of the MTC-specific target genes Heli and IS 1081 generated with the field tissue samples of red deer

Animal No.	Tissue	Weight in grams	Protocol 1		Protocol 2		Protocol 3		Protocol 1 Overall result	Protocol 2 per animal	Protocol 3
			Heli	IS 1081	Heli	IS 1081	Heli	IS 1081			
1	Intestinal In	5	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	–
2	Intestinal In	3	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	no ct	negative	negative	negative
3	Mesenteric In	2	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	–
4	Intestinal In	8	no ct	no ct	no ct	no ct	–	–	negative	negative	–
5	Intestinal In	3	no ct	no ct	no Ct	no Ct	–	–	negative	negative	–
6	Peritoneum	2	no ct	no ct	no Ct	no Ct	–	–	negative	negative	–
7	Intestinal In	4	no ct	no ct	no Ct	no Ct	41.90	no ct	negative	negative	negative
8	Mesenteric In	3	35.63	34.79	ne	ne	–	–	positive	–	–
9	Intestinal In	3	no ct	37.57	ne	ne	–	–	positive	positive	–
10	Lung	5	26.27	26.14	27.00	27.20	–	–	negative	negative	–
	Intestinal In	2	no ct	no ct	no Ct	no Ct	–	–			
11	Lung	3	no ct	no ct	ne	ne	–	–	positive	positive	positive
	Intestinal In	19	33.78	35.20	35.02	35.53	33.11	33.60			
12	Retropharyngeal In	3	no ct	39.54	38.09	37.96	41.77	41.11	positive	positive	positive
	Intestinal In	5	37.54	36.79	35.67	36.38	37.82	38.08			
13	Retropharyngeal In	11	no ct	no ct	38.82	39.81	37.03	36.81	positive	positive	–
	Lung	7	33.74	34.62	35.90	36.20	–	–			
	Pleura	2	37.14	37.07	36.10	37.20					
	Palatine tonsil	3	35.49	36.08	33.20	33.10					
	Mass	8	34.03	38.53	32.80	33.10					
14	Diaphragm	11	31.85	31.84	38.10	37.60			negative	negative	negative
	Lung	3	no ct	no ct	no Ct	no Ct	no ct	no ct			
15	Retropharyngeal In	8	no ct	no ct	no Ct	no Ct	no ct	39.92	negative	negative	negative
16	Intestinal In	2	no ct	no ct	ne	ne	no ct	no ct	negative	–	negative
17	Retropharyngeal In ^a	5	17.95	25.95	26.88	27.61	25.91	26.25	positive	positive	positive
18	Intestinal In	2	no ct	no ct	no Ct	no Ct	no ct	no ct	negative	negative	negative

In lymph node, ne not evaluable

– not done

^amicroscopic examination of Ziehl-Neelsen-stained sediments

had a questionable result ($n = 1$) and 17.5 % tested positive for MTC DNA ($n = 13$). In the case of red deer samples ($n = 26$) protocol 1 produced the following results: 57.7 % of the samples ($n = 15$) tested negative for MTC-specific DNA, while 38.5 % ($n = 10$) were positive and only 3.8 % ($n = 1$) were considered equivocal.

DNA extraction according to protocol 2 – MTC results

Seventy-four bovine tissue samples were investigated by magnetic capture protocol and revealed reliable results by real-time PCR (see Table 2). The detection rate of MTC positive samples increased up to 24.3 % ($n = 18$) and consequently the detection rate for negative results decreased to 68.9 % ($n = 51$). The number of questionable results increased to 4.05 % ($n = 3$, animal no. 11, 13 and 20), which were positive in protocol 1. This was not

unexpected since only suboptimal tissue samples were available for protocol 2 (leftovers sometimes without granuloma after official screening of the samples had been completed). Two samples (animal no. 18 and 23) were not evaluable with the new method (2.70 %) and they did not show any Ct-values, neither for β -actin nor for Heli or IS 1081. However, these samples showed sample weights less than three grams.

Additionally, 26 tissue samples from red deer were screened by magnetic capture protocol and revealed evaluable results by real-time PCR (Table 3). In total 42.3 % of the samples ($n = 11$) tested positive for bTB. Furthermore, we found 15.4 % of the samples not evaluable as they did not produce any Ct-values neither for β -actin nor for Heli or IS 1081 ($n = 4$; animal no. 8, 9, 10 and 16). These non-evaluable organs also had a weight less

than three grams like mentioned above for cattle tissue samples which were unevaluable.

While the same number of red deer samples tested positive with both protocols ($n = 10$; 38.5 %), protocol 2 could detect one more sample as MTC positive, which was considered negative in protocol 1 (animal no. 11). Instead, one sample positive in protocol 1 was not evaluable with protocol 2 (animal no. 8). Animals no. 10 and 16 were not analyzable after magnetic capture and negative in protocol 1. Animal no. 9 was tested negative after magnetic capture but considered equivocal with protocol 1.

DNA extraction according to protocol 3 – MTC results

Thirty-eight of 74 bovine tissue samples were screened with an additional DNA extraction method, protocol 3. Protocol 3 increased the fraction of positive MTC results up to 31.6 % ($n = 12$) and equivocal results increased from 2.6 % ($n = 1$, Table 2, animal no. 11) in protocol 1 to 7.9 % ($n = 3$, animal no. 11, 16, and 23) in protocol 3. In turn negative results decreased to 55.3 % ($n = 21$). However, Ct-values of doubtful samples appeared slightly above the detection limit at $C_t = 39.00$.

Furthermore, 11 of 26 tissue samples from red deer were tested according to protocol 3. Overall, 63.6 % of the sediments ($n = 7$) were negative for MTC DNA, while 36.4 % ($n = 4$, Table 3, animals no. 11, 12, and 17) tested positive. With protocol 1 we found 72.7 % ($n = 8$) negative and only 27.3 % ($n = 3$) positive for MTC.

Ct-values of the three different extraction methods for β -actin

Protocol 1 and 3 resulted in average $C_{t\beta\text{-actin}} = 21.61$ and $C_{t\beta\text{-actin}} = 21.56$, respectively, whereas with protocol 2 we found less β -actin with an average $C_{t\beta\text{-actin}} = 27.24$ (Additional file 2: Table S2). Average Ct-values for β -actin in red deer tissue samples resembled those generated for cattle tissue samples: protocol 1 $C_{t\beta\text{-actin}} = 20.85$; protocol 2 $C_{t\beta\text{-actin}} = 29.04$; protocol 3 $C_{t\beta\text{-actin}} = 20.30$ (Additional file 3: Table S3).

DNA quality and quantity

For protocol 2 an average value of 15.6 $\mu\text{g/ml}$ was calculated for the DNA amount and DNA purity was on average at 1.70 (A260/A280). For protocol 3 DNA amount was on average at 281.4 $\mu\text{g/ml}$ and DNA purity at 1.84 (A260/A280).

Overall results per animal - comparison of protocol 1 and 2 ($n = 34$ cattle and $n = 18$ red deer)

In ten of 34 cattle, from which tissue samples were processed according to protocol 1, MTC-specific DNA was detected by real-time PCR in at least one of the 11 tissue samples. These animals were considered positive for bTB. No MTC-specific DNA was detected in the samples of the

other 24 cattle examined in this study and consequently they were considered negative for bTB. According to the same criteria, six of 18 red deer were tested positive and 12 were tested negative for bTB. Usually, from red deer only one tissue sample per animal was available and was initially examined with protocol 1. The remains of this sample, which were in general very small, were then used for further processing with protocol 2 and 3. Protocol 2 revealed six more cattle as bTB-positive (animal no. 14, 21, 23, 25, 29 and 30) compared to protocol 1. Cattle no. 13 was classified as positive with protocol 1 and equivocal with protocol 2. However, the Ct-value for gene IS 1081 ($C_{t\text{IS } 1081} = 39.25$) was only slightly above the detection threshold of $C_{t\text{IS } 1081} = 39.00$. No cattle previously classified as bTB-positive with protocol 1 was classified negative with protocol 2. In the case of red deer samples, protocol 2 allowed five animals to be classified as bTB-positive and 11 animals as bTB-negative. Two red deer could not be categorized with protocol 2, because only one small tissue sample per animal was available for further testing and both did not yield evaluable results. Therefore, a DNA extraction with protocol 2 was performed.

Comparison of protocol 1, 2 and 3 ($n = 23$ cattle and $n = 9$ red deer)

Selected samples from nine of all 18 red deer cases and 23 of all 34 bovine cases were further processed according to protocol 3. Five cattle and three red deer cases had been classified as bTB-positive, while 18 cattle and six red deer were classified as negative by using protocol 1. In contrast the employment of protocol 2 and 3 yielded in ten bTB-positive bovine cases, while protocol 3 produced an additional equivocal result (Table 2, animal no. 23). In this case, $C_{t\text{IS } 1081}$ was 40.23, so only slightly above the detection limit. Twelve cattle were classified negative by these two methods. Red deer testing with protocol 3 produced the same results as protocol 1: three cervids were bTB-positive and six negative. As with protocol 2 two samples from red deer cases could not be analyzed and no sample material was left to repeat the analysis.

Statistical analysis - kappa index

The three extraction protocols resulted in a moderate (0.52; protocol 1 vs 3) to almost perfect agreement (1.00; red deer sample testing with all protocols). The calculated values are shown in Table 4.

Mycobacterial cultivation

A total number of 16 animals were tested by culture in this study. Culture material was obtained from ten cattle and six red deer cases, which had tested bTB-positive by real-time PCR. Samples showed bacterial growth after four to eight weeks of incubation on solid and/or liquid

Table 4 Diagnostic efficiency of the three DNA extraction protocols: agreement between tests (Kappa index, k)

Species	Reference	Agreement (k)	Interpretation
Cattle Table 2	P1 vs P2	0.621	Substantial agreement
	P1 vs P3	0.522	Moderate agreement
	P2 vs P3	0.789	Substantial agreement
Red deer Table 3	P1 vs P2	1.00	almost perfect agreement
	P1 vs P3	1.00	almost perfect agreement
	P2 vs P3	1.00	almost perfect agreement

media. Single colonies from these cultures were used for species identification and were all confirmed as *M. caprae* by GenoType MTBC (Hain Lifescience, Nehren, Germany; data not shown).

Evaluation of the Ziehl-Neelsen staining of the sediments

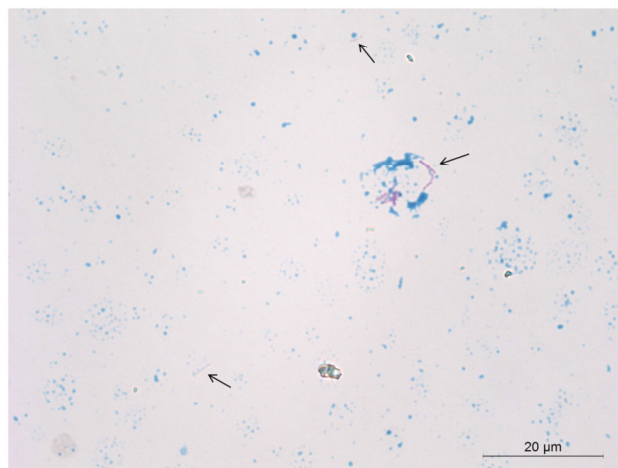
Acid fast bacilli were clearly visible (Fig. 1) when two Ziehl-Neelsen stained sediments that showed low Ct-values for Heli and IS 1081 in protocol 3 were evaluated microscopically (animal no. 18, Table 2 and no. 17, Table 3). Viability of the microbes was not assessed. Microscopic examination of two sediments considered MTC-negative by PCR provided no evidence of acid fast bacteria (animal no. 7 and 22, Table 2).

Discussion

The chronic course of mycobacterial infection leads to long incubation periods, where infected individuals remain clinically asymptomatic. In animals shedding of mycobacteria before clinical manifestation of tuberculosis is critical and thus controlled surveillance is an essential instrument to control the spread of the mycobacteria

[25, 26]. Due to the lack of clinical signs, diagnostic procedures for the detection of bTB in cattle are challenging, expensive and currently are based on an authority regulated prescribed protocol. Cellular immune reactions as represented by the tuberculin skin test, preferably the SICCT or the interferon gamma release test, indicate the infectious status of an animal. The in vivo immune response should be confirmed post mortem by direct detection of the pathogen or its DNA using PCR and/or culture isolation [18, 19]. For DNA extraction of a template for subsequent PCR, only small amounts of tissue (preparations up to a maximum of 1 g, hence 200–400 µl for DNA extraction) are commonly used. This may lead to false negative results due to the well-known inhomogeneous distribution of mycobacteria in tissue material [27]. In addition, animals infected in an early pre-granuloma forming status can contain macroscopically normal but infected organs (NVL, non-visible lesions). This situation makes it impossible to recognize mycobacterial presence and location in the organ to allow targeted MTC-specific DNA extraction. Consequently, DNA extraction methods, which improve the sensitivity for mycobacterial DNA detection, are urgently needed [17, 27]. It was hypothesized that this problem might be solved when large sample volumes are processed and MTC-specific DNA can be concentrated and captured in the sample material. A magnetic capture protocol established in this study (protocol 2) was proven to be a sufficient method for MTC DNA detection by the use of artificially spiked lymph nodes.

This protocol revealed stable results with the MTC real-time PCR. However, it was not possible to define the detection limit of this method due to the fact that

**Fig. 1** Picture of a Ziehl-Neelsen stained sediment. The arrows indicate the presence of acid fast bacilli

pathogenic mycobacteria have a hydrophobic and waxy mycolic acid layer in the cell wall so that the bacteria can attach to each other [28]. Consequently, separation and accurate quantification of these pathogens by bacterial count is not possible [29]. A reliable quantification on the gene copy number of Heli or IS 1081 was also not possible, because *M. caprae* seems to exhibit substantial genetic variations within its genome as described for the RD4 region, and also possibly virulence related regions [30, 31]. Furthermore, as little information is available in the literature concerning the exact number of gene copies for IS 1081 [32] and Heli [33–35] it was not possible to define the detection limit on the basis of gene copy numbers in the analyzed *M. caprae* subtypes. Instead, the decrease in Ct-values was chosen as the parameter that defines an improvement of the extraction protocol.

By extracting DNA from field samples of naturally infected cattle and red deer with protocol 2 and subsequently generating reliable and evaluable results with the real-time PCR for β -actin, Heli and IS 1081 we did proof that with the new protocol we cannot only efficiently extract DNA from tissue samples containing high amounts of bacteria such as artificially spiked lymph nodes for establishing the new protocol, but also from samples containing low numbers of bacteria such as field samples from naturally infected animals. Organs with NVL are the most common problems when only small sample volumes are used for culture and DNA extraction [12, 36]. We were able to show that artificially spiked lymph nodes (*M. bovis* BCG) processed with protocol 2 resulted in a 100 % positive MTC detection rate. However, only 40 % of the artificially spiked lymph nodes revealed positive results when samples were processed using the prescribed DNA extraction protocol (protocol 1). These results underline that the use of small sample sizes (~20 to 40 mg) decreases the probability for targeted DNA extraction and can lead to false negative results. Using the DNA extraction protocol 1 a reasonable number of bovine and red deer field samples ($n = 100$) were tested as equivocal or even negative that later on had been confirmed to contain *M. caprae* by culture isolation. On the other hand, using a larger sample mass, more samples were found to be positive with the magnetic capture protocol ($n = 23$ with protocol 1; $n = 28$ with protocol 2). These results confirmed this method to be more sensitive compared to protocol 1. Since the established magnetic capture protocol specifically enriches MTC DNA, the procedure is useful especially when only small numbers of target genes are expected in organs like NVL organs. Samples, that had to be qualified as equivocal or negative using protocol 1 turned out to be positive ($n = 5$) or to a lesser extend still equivocal ($n = 2$) when protocol 2 was applied. We even assume that more samples would have been assessed as

M. caprae positive, when one considers that suboptimal tissue samples – only remnant tissues after protocol 1 had been available – had to be processed for application of protocol 2. Leftover material most likely did not contain mycobacteria anymore, because granulomas were largely used for the officially prescribed diagnostic methods. Furthermore, in most cases not all 11 tissue samples of the bTB suspicious animal were available and again we were only able to investigate the remnant organ tissue sets. This explains why samples that had been tested positive for bTB (protocol 1) generated only equivocal or even negative results when protocol 2 was applied (Table 2, No. 67). In six out of 100 organ samples we were not able to generate Ct- values, neither for β -actin nor for Heli or IS 1081. These samples weighed less than 3 g. In these cases we speculate that the applied proteinase K concentration was probably too high and the released DNA was digested or otherwise destroyed. Consequently, protocol 2 should only be used for a sample mass larger than 4 g or proteinase concentration should be adjusted to the small sample volumes. Nevertheless, for all samples above 4 g the results presented in this study show that the magnetic capture protocol is a valuable tool to improve accessibility to mycobacteria inhomogeneously distributed in sample material. In addition, MTC-specific capture oligonucleotides ensure the target-oriented fishing of MTC DNA onto magnetic particles and allow inhibitory substances and non-target DNA to be washed away and removed. This assumption was proved by the decrease of β -actin Ct- values from of around $Ct_{\beta\text{-actin}} = 21.00$ in protocols 1 and 3 to $Ct_{\beta\text{-actin}} = 27.00$ in protocol 2 and also by the yarding DNA amounts generated with the different protocols. The high amounts of overall DNA obtained with protocol 3 - and probably also with the similar protocol 1 - are not surprising, because MTC-specific DNA was not concentrated and large amounts of host DNA is present in the samples. Interestingly, the purity of DNA generated with protocol 3 is slightly better compared to the DNA obtained with the magnetic capture protocol, probably a result of the efficient purification process on a silica-based matrix. These findings convincingly demonstrate that the specific capture oligonucleotides efficiently eliminate host DNA while MTC-specific DNA remains in the solution for further processing. Consequently, inhibitory substances such as collagen and hematin [37] can be reduced and unevaluable PCR-results, which may be obtained due to inhibitory substances, can be avoided. The magnetic capture method, however, is labor-intensive and time consuming compared to protocol 1 and should be considered as not suitable for daily use in routine diagnostics. To overcome these problems, pellets of the homogenized and digested material ($n = 49$) were further processed with

protocol 1, which led to a time reduction of about 3 h compared to protocol 2. The time needed for DNA extraction with protocol 3 is similar to the time needed for DNA extraction with the current used protocol (protocol 1). The modified method allows the simultaneous processing of several samples. In contrast, to the magnetic capture protocol there is no limitation concerning the sample size (samples < 3 g), a fact that may have led to the highest proportion of positive PCR results (protocol 3 and 2, $n = 16$; protocol 1, $n = 11$) in comparison to the other two protocols. However, when small bacterial loads or inhibitory substances due to lytic tissue material are expected, the more time consuming magnetic capture protocol (protocol 2) is recommended as no target DNA is concentrated with protocol 3. DNA release from mycobacterial cells and DNA concentration is critical as successful molecular detection largely depends on the efficiency of the DNA extraction method [38]. Cell wall disruption can be achieved in various ways like mechanical disruption, enzymatic or chemical lysis or a combination of these methods. We chose a combination of mechanical disruption by bead-beating (FastPrep 96 machine) in combination with and an enzymatic digestion (proteinase K) as satisfactory results were achieved in previous studies [39, 40]. Additionally, digestion time was increased to an overnight-incubation step and subjoined by two inactivation steps for 15 min at 99 °C. However, destruction of all acid-fast bacilli was not efficient when these modifications were applied as several nests of bacteria were still visible after Ziehl-Neelsen staining of the sediments. Mycobacteria were detectable in nests or as single red rods, some continuously and others discontinuously dyed. We expect that the bacilli were not infectious anymore and that the cell wall was damaged in such a way that MTC-specific DNA was released from the bacilli and similar results were obtained with protocol 3 as with protocol 2.

We compared the three different extraction methods at two different levels. At the first level, we compared the Ct-values per tissue sample so that we were able to make accurate statements whether MTC-specific Ct-values increased or a decreased when a specific extraction method was applied. From the epidemiological point of view, the most important unit to consider is the animal. So we compared at the second level the three extraction methods on the basis of the overall result per animal. When a single sample of the 11 tissue samples collected per animal is positive for MTC-specific DNA, the animal is considered bTB-positive. The kappa indices for comparison of the three DNA extraction protocols were calculated at this level. Culture as the gold standard for bTB diagnostics, could not be included for the purpose of comparison because tissue samples had been selected based on their positive or equivocal PCR status

and were then further processed for cultivation. Hence, protocol 1 was chosen as reference method to compare the results produced with the three extraction methods.

Since the tissue samples used for this project were incomplete due to preceding testing, we cannot make any statement about the infection frequency in relation to target organs. Most frequently intestinal and lung lymph nodes together with parts of lungs responded positive for *M. caprae* in this study. If kidney or liver were positive for MTC-specific DNA, it was most likely that intestine and lungs were also affected. To limit work time and costs, it would be preferable to select only the most susceptible organs or to pool suspicious organs for further processing in accordance with protocol 2. As PCR testing of tissue samples with NVL in combination with the inhomogeneous distribution of *Mycobacteria* spp. and the small sample size that is used in the prescribed protocol may result in false negative results, the newly developed DNA extraction methods allow the investigation of a larger sample volume for DNA extraction and therefore increase the probability to detect MTC-specific DNA in animal tissue.

Conclusion

Magnetic capture is a robust and highly sensitive method for targeted MTC-specific DNA detection in larger tissue masses, especially when a small inhomogeneous bacterial load is expected or if only autolytic sample material is available. For daily routine diagnostics, protocol 3 (sediment screening of large sample volumes) is recommended as processing of large sample masses can be performed in a short time. Both newly established protocols offer reliable MTC-specific DNA extraction from larger tissue masses, which increases the detection rate in subsequent PCR protocols compared to the commonly used small tissue pieces.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Reagents used for tissue processing in relation to the tissue mass. (DOC 43 kb)

Additional file 2: Table S2. Ct-values of β -actin DNA detection in field tissue samples of cattle achieved in the three DNA extraction protocols. (DOC 157 kb)

Additional file 3: Table S3. Ct-values of β -actin DNA detection in field tissue samples of red deer achieved in the three DNA extraction protocols. (DOC 74 kb)

Acknowledgments

We thank the Bavarian Health and Food Safety Authority, Oberschleißheim, Germany for the collaboration, for providing sample material and the *M. bovis* BCG strain. Special thanks also to the official veterinarians from the district office Upper Allgäu, in particular Dr. Mages and Dr. Baur, who informed us of current government control measures. Last but not least I want to thank Carola Sauter-Louis for helping with the statistical analysis.

Funding

We gratefully acknowledge the financial support of the Bavarian State Ministry for Food, Agriculture and Forestry.

Availability of data and materials

All relevant data generated or analysed during this study were included in this published article and its supplementary information files.

Authors' contributions

SF executed the DNA extraction protocols and real-time PCR experiments, analysed the data and drafted the manuscript; MB coordinated the experiments at the LGL, participated in the study design at the LGL and critically revised the manuscript; SB executed the first steps of the DNA extraction under BSL3 conditions and helped selecting tissue samples from cattle and red deer; PZ provided the real-time PCR results of the current diagnostic protocol for comparison with the new DNA extraction methods and critically revised the manuscript; AR participated in the design of the study, coordinated the experiments at the LMU Microbiology Department, participated in the analysis of the data and enhanced the manuscript; RKS coordinated and supervised the study at the LMU Microbiology Department and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All tissue samples that were used in this study were collected from animals that have been killed in the framework of state animal disease control. The culling of cattle and the shooting of red deer was performed according to the general administrative regulation for the implementation of the Animal Welfare law [41, 42]. In addition, all samples were anonymized making it impossible for the reader to find out their origin.

Author details

¹Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich, Germany. ²Bavarian Health and Food Safety Authority, Veterinaerstr. 2, 85764 Oberschleißheim, Germany.

Received: 29 March 2016 Accepted: 18 August 2016

Published online: 15 September 2016

References

- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(Pt 6):1785–9.
- Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1970;20(3):273–82.
- O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*. 1995;76 Suppl 1:1–46.
- Prodinger WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E. *Mycobacterium caprae* infection in humans. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(12):1–13.
- Rue-Albrecht K, Magee DA, Killick KE, Nalpas NC, Gordon SV, MacHugh DE. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the mycobacterium genus. *Front Immunol*. 2014;5:536.
- Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J*. 2002;163(2):115–27.
- Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol*. 1994;40(1–2):153–77.
- Pal PG, Horwitz MA. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 1992;60(11):4781–92.
- Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet Microbiol*. 2006;112(2–4):151–61.
- Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(4):334–41.
- Costello E, Egan JW, Quigley FC, O'Reilly PF. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet Rec*. 1997;141(9):222–4.
- Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol*. 1994;40(1–2):53–63.
- Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J*. 1990;67(11):389–92.
- Morrison WJ, Boume FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney JP, Woodroffe R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. Independent Scientific Group on Cattle TB. *Vet Rec*. 2000;146(9):236–42.
- 97/76/EC D. Richtlinie 97/76/EG des Rates vom 16. Dezember 1997 zur Änderung der Richtlinien 77/99/EWG und 72/462/EWG in bezug auf die Vorschriften für Hackfleisch/Faschiertes, Fleischzubereitungen und bestimmte andere Erzeugnisse tierischen Ursprungs. Luxembourg: Europarecht; 1997.
- Fink M, Schleicher C, Gonano M, Prodinger WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degjorgis MP, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, et al. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(3):464–7.
- Rettinger A, Broeckl S, Fink M, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Domogalla J, Just F, Gellert S, Straubinger RK et al. The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes. *Transbound Emerg Dis*. 2015. doi:10.1111/tbed.12438.
- RindTb-VQ. Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung). 2014. p. 388.
- Federal Research Institute for Animal Health. Official collection of methods for the sampling and investigation of materials of animal origin for notifiable animal diseases (method collection). 2015. p. 1–24.
- Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, Cadranet J, Lecossier D, van Embden J, Hance AJ. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1996;34(5):1209–15.
- Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, De Craeye S, Bokken G, Aizenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol*. 2010;139(3):193–201.
- Isaksson M, Hagström Å, Armua-Fernandez MT, Wahlström H, Ågren EO, Miller A, Holmberg A, Lukacs M, Casulli A, Deplazes P, et al. A semi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-time PCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples. *Parasite Vector*. 2014;7:583.
- Grant IR, Stewart LD. Improved detection of *Mycobacterium bovis* in bovine tissues using immunomagnetic separation approaches. In: Cunha VM, Inácio J, editors. *Veterinary infection biology: molecular diagnostics and high-throughput strategies*. New York: Springer New York; 2015. p. 153–61.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
- Domingo M, Vidal E, Marco A. Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 2014;97(Suppl):S20–9.
- Menin A, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, Pilati C, Báfica A. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS One*. 2013;8(1):e53884.
- Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Morán J, Hermoso de Mendoza J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*. 2008;127(3–4):315–24.
- Silva C, Ekizlerian S, Fazioli R. Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Am J Pathol*. 1985;118(2):238.
- Cheng N, Porter MA, Frick LW, Nguyen Y, Hayden JD, Young EF, Braunstein MS, Hull-Ryde EA, Janzen WP. Filtration improves the performance of a high-throughput screen for anti-mycobacterial compounds. *PLoS One*. 2014;9(5):e96348.
- Domogalla J, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Gellert S, Muller M, Neuendorf E, Sedlmaier F, Büttner M. Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *J Clin Microbiol*. 2013;51(5):1381–8.
- de la Fuente J, Díez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Tobes R, Manrique M, López V, Romero B, Bezós J, et al. Comparative genomics of field isolates of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* provides evidence for possible correlates with bacterial viability and virulence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(11):e0004232.

- 32 Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res*. 2007;3:12.
- 33 Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology*. 1995; 141(Pt 9):2131–8.
- 34 Moser I, Proding WM, Hotzel H, Greenwald R, Lyashchenko KP, Bakker D, Gomis D, Seidler T, Ellenberger C, Hetzel U, et al. *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol*. 2008;127(3–4):399–406.
- 35 Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(12):2668–73.
- 36 Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One*. 2013;8(3):e58374.
- 37 Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci*. 2010;55(1):25–33.
- 38 Nakatani SM, Burger M, Assef MC, Brockelt SR, Cogo LL, Messias-Reason IJ. Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(11):851–4.
- 39 Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Lett Appl Microbiol*. 2008;47(1):8–11.
- 40 Radomski N, Kreitmman L, McIntosh F, Behr MA. The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PLoS One*. 2013;8(10):e78749.
- 41 TierGesG. Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz - TierGesG), zuletzt geändert durch Art. 8 Abs. 12 G. v. 3.12.2015. 2013.
- 42 TierSchG. Tierschutzgesetz, Neugefasst durch Bek. v. 18.05.2006 I 1206. 1313; zuletzt geändert durch Art. 8 Abs. 13 G. v. 03.12.2015 I 2178. 1972.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



IV DISKUSSION

Eine Infektion mit Mykobakterien aus dem MTC führt aufgrund ihrer zumeist langen Inkubationszeit zu einem langsam fortschreitenden chronischen Krankheitsverlauf, in dem infizierte Individuen keine klinischen Anzeichen für eine Erkrankung zeigen. Aufgrund dieser Problematik kann eine mögliche Erregerausscheidung nicht sicher erkannt werden und der Erreger kann sich unentdeckt innerhalb einer Population verbreiten. Daher ist eine ständige Überwachung der Rinderbestände essentiell, um die Verbreitung des Erregers zu kontrollieren und zu verhindern (MENIN et al., 2013; DOMINGO et al., 2014).

Die Diagnose der bovinen Tuberkulose bei Rindern stellt aufgrund des Fehlens klinischer Anzeichen und der sich nur langsam im Krankheitsverlauf entwickelnden pathologischen Veränderungen in Organen, die nicht routinemäßig in der Schlachtkörperbeschau untersucht werden, eine besondere Herausforderung dar (VORDERMEIER et al., 2008) und ist zudem ein relativ teures Verfahren, das durch die Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes gesetzlich vorgeschrieben ist. Als diagnostische Möglichkeiten stehen indirekte *intra vitam* Methoden wie der Tuberkulin-Hauttest und ein IFN- γ -Freisetzungstest als Nachweis einer zellulären Immunantwort zur Verfügung, die allerdings zunächst nur eine Verdachtsdiagnose ermöglichen. Dieser Verdacht muss dann über einen direkten Erregernachweis in Form von kultureller Isolation oder eines spezifischen DNA-Nachweises des Erregers bestätigt werden (RINDTB-VO, 2014). Die kulturelle Isolation des Erregers gilt auch heute noch als Goldstandard in der Diagnose für Tuberkulose (LIÉBANA et al., 1995; VORDERMEIER et al., 2008). Allerdings birgt diese Form des Erregernachweises auch Nachteile, wie mögliche falsch-negative Ergebnisse bei nicht mehr vermehrungsfähigen Erregern in der zu untersuchenden Probe, der lange Zeitraum bis zur Diagnose durch das langsame Wachstum der pathogenen Mykobakterien und die damit verbundene Kontaminationsgefahr durch Begleitflora (WARDS et al., 1995; CARDOSO et al., 2009). Außerdem müssen die Erreger der bovinen Tuberkulose, *M. bovis* und *M. caprae*, nach Kultivierung noch durch weitere Differenzierungsmethoden bestätigt werden, was den Zeitaufwand und die Kosten weiter erhöht (WARDS et al., 1995).

Daher stellt die PCR grundsätzlich als schnelles und einfaches Verfahren eine gute diagnostische Möglichkeit dar, die zudem auch nicht mehr vermehrungsfähige Erreger nachweisen kann (LIÉBANA et al., 1995). Wie bereits beschrieben, werden dabei routinemäßig für die DNA-Extraktion nur sehr geringe Probenvolumina von 200 - 400 µl homogenisierten Gewebes verwendet (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015). Da jedoch bei Tieren in der frühen Infektionsphase Granulome als sichtbare Läsionen noch nicht entwickelt sind („non visible lesions“) oder die Mykobakterien inhomogen in Form von kleinen Granulomen in nur wenigen Organen vorkommen und nicht disseminiert über den Gesamtorganismus verteilt sind (CORNER et al., 1990; MORRISON et al., 2000), ist eine gezielte Probenentnahme um MTC-DNA zu detektieren kaum möglich und es kann leicht zu falsch-negativen PCR-Ergebnissen kommen. Daher ist es unbedingt notwendig, Methoden zu entwickeln, die die Wahrscheinlichkeit einer MTC-DNA-Detektion aus tierischem Gewebe steigert.

Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Extraktionsverfahren zu entwickeln, die in die Routinediagnostik im Rahmen der staatlichen Tierseuchenbekämpfung integriert werden können und dabei den Einsatz größerer Probenvolumina für die DNA-Extraktion zu ermöglichen, um so die Sensitivität des Erregernachweises zu erhöhen und die Ergebnisse aus diesen Protokollen mit den Ergebnissen aus dem bisher vorgeschriebenen Protokoll zu vergleichen.

1 Der Einsatz alternativer Extraktionsverfahren aus größeren Probenvolumina zur Verbesserung der Diagnostik der bovinen Tuberkulose

Obwohl Deutschland die Rindertuberkulose erfolgreich bekämpft hat und seit 1996 offiziell frei von Rindertuberkulose ist, treten auch heute noch immer wieder bTB-Fälle bei Rindern und Rotwild auf (MENGE et al., 2016).

Das Fehlen klinischer Anzeichen einer Erkrankung beim Rind, der langsame, nicht generalisierte und chronische Verlauf und das Fehlen spezifischer Krankheitsanzeichen bei Ausbruch der Krankheit machen eine Diagnose und eine Identifizierung von Ausscheidern am lebenden Tier schwer bis unmöglich (RAMOS et al., 2015). Auch die vorgeschriebenen indirekten Nachweismethoden haben deutliche Schwächen beim Nachweis und ermöglichen daher lediglich eine Verdachtsdiagnose (DE LA RUA-DOMENECH et al., 2006; RINDTB-VO, 2014). Zusätzlich können die Testsysteme durch falsche Durchführung (OIE, 2009) und die fehlende Standardisierung der Tuberkuline (SCHILLER et al., 2010a) zu falschen Ergebnissen führen.

Die real-time PCR als schnelles, einfaches und spezifisches Verfahren stellt sich als sehr sensitiv dar, wenn es nach kultureller Isolation von Mykobakterien angewendet wird, jedoch hat es Schwächen hinsichtlich der Sensitivität bei der Anwendung in klinischen Proben, insbesondere Gewebeproben. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Gewebeproben (WARDS et al., 1995), die unterschiedlich effizienten DNA-Extraktionsmethoden (NAKATANI et al., 2004) und durch die inhomogene und lokal begrenzte Verteilung der Bakterien in der Gewebeprobe nahe dem Infektionsort erklären (PARRA et al., 2008). Außerdem besitzen Mykobakterien eine besonders stabile Zellwand, die eine effiziente Lyse des Erregers und die mykobakterielle DNA-Freisetzung erschweren (LIÉBANA et al., 1995; AMARO et al., 2008). Daher wäre es von Vorteil, die Sensitivität der real-time PCR durch einen effizienteren Aufschluss der mykobakteriellen Organismen und durch eine bessere Aufreinigung der zu untersuchenden Gewebeproben zu steigern, um ein schnelles und sicheres Ergebnis hinsichtlich des bTB-Status eines Tieres zu erhalten.

Somit war es Ziel der Studie, diesen diagnostischen Zweig zu verbessern. Dabei konzentrierte sich unsere Studie auf die Optimierung der DNA-Extraktion, da die

mangelnde Sensitivität der real-time PCR höchstwahrscheinlich aus Schwächen hinsichtlich des für die Extraktion eingesetzten Probenvolumens und des DNA-Extraktionsverfahrens an sich resultiert.

Der Verdau eines ganzen Lymphknotens oder eines beliebigen Organstückes bis zu 15 g im Gegensatz zum bisher eingesetzten Probenvolumen von 200 - 400 µl für die DNA-Extraktion erhöht erheblich die Wahrscheinlichkeit eines MTC-DNA-Nachweises, was unter anderem durch Vorversuche bestätigt werden konnte (Tabelle A 3, Anhang). Wie in der Publikation (Abschnitt „Results“, Seite 6 – 11) beschrieben, konnte dies in der Feldstudie ebenfalls bestätigt werden, bei der 28 Gewebeproben mit der MC Methode und nur 23 Proben mit dem herkömmlichen Verfahren als MTC-positiv detektiert wurden. Ebenso wurde bereits in der Publikation (Abschnitt „Discussion“, Seite 11 – 13) angesprochen, dass es als wahrscheinlich anzusehen ist, dass noch mehr Proben mit der Magnetic Capture Methode hätten als MTC-positiv detektiert werden können, da die Proben im Rahmen der amtlichen Untersuchung zuerst mittels des amtlich vorgeschriebenen Protokolls untersucht wurden und für die neuen Protokolle nur noch die Probenreste verwendet werden konnten. Waren daher verdächtige Läsionen in der Probe vorhanden, wurden diese zumeist bereits größtenteils entfernt und enthielten keine oder signifikant weniger detektierbaren Mykobakterien. Außerdem standen nicht die vollständig zu untersuchenden Organsets von je elf Organen pro verdächtigem Tier zur Untersuchung zur Verfügung, sodass die vorrangig befallenen Organe wie Lungenlymphknoten, Darmlymphknoten oder Teile der Lunge bereits in der amtlichen Untersuchung aufbereitet wurden und nicht mehr für die neuen Extraktionsprotokolle zur Verfügung standen. Ein Nachweis von Mykobakterien beispielsweise aus der Niere eines Tieres im Gegensatz zu einem Lungen- oder Darmlymphknoten, ist als unwahrscheinlicher zu erachten, da die primäre Infektion meist aerogen oder alimentär erfolgt und sich auch dort zunächst lokal manifestiert (PETO et al., 2009). In frühen Infektionsstadien und noch nicht generalisierten Infektionsverläufen ist ein Nachweis von MTC-DNA aus der Niere daher als eher unwahrscheinlich anzusehen, was sich auch auf die Ergebnisse der Studie ausgewirkt haben könnte. Wären lediglich die für eine Infektion typischen Organe mittels beider neuen Extraktionsverfahren getestet worden und nicht nur die verbliebenen Organreste von Leber oder Niere, hätten vermutlich noch mehr Gewebeproben als bTB-

positiv diagnostiziert werden können, was sich wahrscheinlich positiv auf den Ausgang der Studie ausgewirkt hätte und eine noch höhere Detektionsrate mittels der neuen Methoden hätte bestätigen können.

Da das Magnetic Capture Verfahren im Vergleich zum herkömmlichen Extraktionsverfahren jedoch relativ kosten- und zeitintensiv ist, ist es kein geeignetes Verfahren für die Routinediagnostik. Um Zeit und Kosten bei dem Verfahren einzusparen und den Einsatz in der Routinediagnostik zu ermöglichen, wurde ein zusätzliches DNA-Extraktionsprotokoll entwickelt, bei dem die Homogenisierung und Lyse des großen Probenvolumens identisch zum Magnetic Capture Protokoll durchgeführt wird, das Lysat dann im weiteren Verlauf zentrifugiert wird und statt des Überstandes das Sediment für die DNA-Extraktion weiter verwendet wird. Dazu kann ein herkömmliches DNA-Extraktionskit (Qiagen Blood and Tissue Kit) verwendet werden. Dieses alternative Verfahren ermöglicht zusätzlich zu einer gesteigerten MTC-DNA-Detektionswahrscheinlichkeit eine Zeit- und Kosteneinsparung und das Bearbeiten von mehreren Proben gleichzeitig und ist damit in der Routinediagnostik im Rahmen einer staatlichen Tierseuchenbekämpfung einsetzbar.

2 Schwächen und Voraussetzungen für die neuen Extraktionsverfahren

Der Einsatz eines großen Probenvolumens in der DNA Extraktion beinhaltet auch Nachteile wie das vermehrte Vorkommen von PCR Inhibitoren aus Blut- und Gewebeteilen und auch ein im Verhältnis zur Bakterien-DNA in der Probe übermäßiges Vorkommen von Wirts-DNA, was sich auf den spezifischen DNA Nachweis mittels real-time PCR negativ auswirken könnte (LIÉBANA et al., 1995).

Dieses Problem lässt sich durch die Anwendung des Magnetic Capture Verfahrens lösen, da es in der Lage ist, spezifisch MTC-DNA aus einem großen Volumen eines homogenisierten und lysierten Gewebestückes anzureichern. Dabei werden effektiv Inhibitoren und überflüssige Wirts-DNA eliminiert und gezielt die Zielsequenzen mittels enzymgekoppelter Magnetpartikel, für die anschließende real-time PCR angereichert (OLSVIK et al., 1994; MANGIAPAN et al., 1996).



Abbildung 13: Darstellung des Prinzips des Magnetic Capture Verfahrens

Dafür wurde die Two-Step-Methode verwendet, bei der zuerst die zu konzentrierenden Sequenzen mittels Biotin-gekoppelter spezifischer Oligonukleotide gefangen und diese Hybride dann wiederum über ein Biotin-bindendes Enzym, Avidin, auf der Oberfläche der Magnetpartikel gefangen wurden. Dazu musste zwar in einem zusätzlichen Schritt das natürlich vorkommende Biotin aus der Gewebeprobe mittels Streptavidin-Sepharose entfernt werden, jedoch zeigten andere Studien, dass diese Methode bessere Ergebnisse lieferte als die One-Step-Methode, bei der die Biotin-gekoppelten Sequenzen zuerst durch das Avidin an die Magnetpartikel gebunden, und erst dann mit der denaturierten DNA aus der Probe inkubiert werden, um eine Hybridisierung zu ermöglichen (MANGIAPAN et al., 1996).

Allerdings hat sich in der durchgeführten Studie gezeigt, dass zu kleine Probenvolumina nicht effektiv mit der MC Methode bearbeitet werden können. Bei Proben, die weniger als 3 g wogen, konnten weder Signale für β -Aktin (interne Extraktionskontrolle) noch für MTC-spezifische Sequenzen in der real-time PCR detektiert werden. Wahrscheinlich ist dies auf eine zu hohe Proteinase-K-Konzentration im Verhältnis zum Probenvolumen zurückzuführen, oder darauf, dass durch die Kombination aus der effizienten mechanischen Lyse durch den FastPrep96 und dem enzymatischen Verdau die nachzuweisende DNA zu sehr beschädigt oder zerstört worden ist. Daher ist bei kleinen Probenvolumina die Extraktionsmethode noch weiter zu optimieren oder ein alternatives Extraktionsverfahren anzuwenden.

Da das MC Verfahren, wie bereits zuvor angesprochen, relativ zeit- und kostenintensiv ist, sollte es nur für Proben von Tieren verwendet werden, die entweder keine bTB-verdächtigen Läsionen aufweisen, jedoch im Tuberkulin-Hauttest positiv reagiert haben oder bei stark autolytischen Proben, in denen übermäßige Inhibitoren-Lasten zu erwarten sind.

Eine Voraussetzung für den Nachweis von MTC-DNA mit den neuen Extraktionsverfahren ist die effiziente Freisetzung von DNA aus den Zellen und insbesondere aus den Pathogenen. Da Mykobakterien aufgrund ihres besonderen Zellwandaufbaus besonders resistent gegenüber äußeren Einflüssen sind (GONZALEZ-Y-MERCHAND et al., 1997), stellt eine effiziente Lyse des Erregers hier eine besondere Herausforderung dar, die auch noch zusätzlich durch die Nest-Bildung von Mykobakterien (SILVA et al., 1985) und ihr Zusammenheften erschwert wird. Als besonders effizient für die DNA Extraktion aus Reinkulturen von Mykobakterien erwies sich aus einer Studie von Amaro et al. eine mechanische Homogenisierung mittels Zirkonium-Kügelchen im FastPrep120-Gerät in Kombination mit einem enzymatischen Aufschluss mittels Proteinase K (AMARO et al., 2008). Daher wurde als weiterführende Untersuchungen für die in der Publikation beschriebene Lyse (Abschnitt „Methods“, Seite 3 - 6) optimiert, indem das Protokoll dieser Studie als Vorlage diente und an größere Probenvolumina angepasst wurde. Die Proben wurden mechanisch mittels Keramik-Kugeln und dem FastPrep96 Gerät in Kombination mit dem enzymatischen Aufschluss mit Proteinase K aufgeschlossen, wobei das Gerät, die Größe der Kügelchen und die Reagenzien an das größere Probenvolumen angepasst wurden.

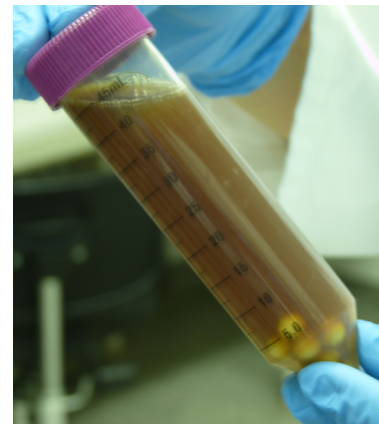
**FastPrep96 Gerät****Keramik-Kugeln****Aufgeschlossene Probe**

Abbildung 14: In der Studie verwendete Materialien für den mechanischen Aufschluss der Gewebeproben

Jedoch konnten durch mikroskopische Untersuchung von gefärbten MTC-positiven Sedimenten aus Gewebekomogenisaten noch einige scheinbar intakte säurefeste Stäbchen sowohl in der Ziehl-Neelsen-Färbung als auch in der Auramin-Rhodamin-Färbung nachgewiesen werden (Abbildungen A 1 und A 2). Da jedoch detektierbare DNA freigesetzt wurde, ist davon auszugehen, dass die Zellwände durch die Behandlung aufgebrochen wurden, sodass ihre DNA freigesetzt werden konnte, die Zellwand jedoch makroskopisch intakt schien. Jedoch sollten solche Proben aus arbeitsschutztechnischen Gründen als potentiell infektiös angesehen werden. Zur Kontrolle und gegebenenfalls nötigen Inaktivierung potentiell noch infektiöser Organismen sollten daher weiterführende Untersuchungen mit anschließender Kultivierung des Sediments unter BSL3 Bedingungen angestrebt werden.

3 Probleme bei der Quantifizierung von Mykobakterien

Eine weitere Schwierigkeit, die sich aus dem Zusammenkleben der Mykobakterien ergab, war eine Vereinzelung der Bakterien zum Bestimmen der koloniebildenden Einheit (KbE; engl.: colony forming units, CFUs). Die Bestimmung der KbE auf festen Nährböden ist allgemein als Goldstandard für die Bestimmung der Zahl lebender Organismen aus einer Probe oder unter experimentellen Bedingungen anerkannt, ist allerdings relativ arbeitsaufwändig und braucht einige Zeit, um ein Ergebnis vorweisen zu können (VAN ZYL-SMIT

et al., 2011). Alternativen sind der Einbau von Uracil in die mykobakterielle DNA, Biolumineszenz-Assays mit Reporterkonstrukt, real-time PCR Assays oder das MGIT-System (BACTEC Mycobacterial Growth Indicator Tube 960, BD, New Jersey, USA) (HESSELING et al., 2010). Allerdings wird für das Anlegen von Kulturen ein BSL3-Labor benötigt, weil Mykobakterien aufgrund ihres zoonotischen Potenzials in die Risikogruppe 3 eingeordnet sind (BIOSTOFFV, 2013).

Cheng et al. beschrieben ein Verfahren um das Problem der Aggregation bei Mykobakterien zu lösen. Sie nutzten einen auf eine Spritze aufsetzbaren Filter um eine *Mycobacterium-smegmatis*-Suspension zu filtrieren und somit die Bakterien zu vereinzeln um anschließend die Zahl der KbE zu bestimmen (CHENG et al., 2014). Diese Studie diente uns für Vereinzelungsversuche als Vorlage. Dazu wurde eine Öse Koloniematerial von *M. bovis* BCG in einem Milliliter PBS suspendiert, mit einigen Kügelchen (Lysing Matrix D, mp Biomedicals, New Jersey, USA) für 30 Sekunden mittels Vortexmischer durchmischt und mittels 5-µm Filter (Millipore SLSVO25LS, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) filtriert. Ein Tropfen der filtrierten Suspension wurde auf einem Objektträger ausgestrichen, mittels Ziehl-Neelsen-Färbung gefärbt und mikroskopisch untersucht. Die Auswertung zeigte, dass die Anzahl der säurefesten Stäbchen nach Filtration deutlich reduziert war und die sichtbaren Stäbchen teils vereinzelt, aber teils noch immer in Klumpen zusammengelagert vorlagen (Abbildungen A 5 und A 6). Ein Detektionslimit und ein artifizielles Beimpfen der Lymphknoten mit einer definierten Menge von Bakterien konnte über diesen Weg nicht genau festgelegt werden und daher wurde im Rahmen der Studie der direkte Vergleich der C_t-Werte der drei Extraktionsprotokolle vorgezogen.

Aus wissenschaftlicher Sicht wäre es natürlich von Nutzen gewesen, eine definierte Nachweisgrenze und Quantifizierung für die neuen Extraktionsprotokolle festlegen zu können. Dies könnte auch über eine Berechnung der in der real-time PCR nachgewiesenen Gene erfolgen, die in einer definierten Anzahl im mykobakteriellen Genom vorkommen. Dafür könnte sich beispielsweise IS 1081 eignen, da in der Literatur angegeben wird, dass dieses Fragment bei den meisten MTC-Mitglieder in sechs Kopien im Genom vorliegt (COLLINS & STEPHENS, 1991; WARDS et al., 1995). Die nah verwandten Mitglieder des MTC sind zwar auf genomischer Ebene zu 99,9 % homolog, unterscheiden sich jedoch durch ihre

RDs und SNPs (BROSCH et al., 2000; RODRIGUEZ-CAMPOS et al., 2014) und selbst innerhalb einer Spezies, wie z. B. bei *M. caprae*, bei dem Genomvariationen mit mindestens vier RD4-Varianten festgestellt wurden. Aufgrund der bekannten genetischen Unterschiede ist also auch eine Quantifizierung der Erreger über die Genkopienzahl der IS 1081 ungenau und nur näherungsweise möglich. Auch dieser Sachverhalt sprach eher für einen direkten Vergleich der C_t -Werte der einzelnen Methoden als für eine Berechnung der Sensitivität und Spezifität mit ungenauen Werten.

4 Direkter Vergleich der Extraktionsmethoden anstelle von Angabe der Sensitivität und Spezifität der neuen Protokolle

Da im Rahmen der staatlichen Tierseuchenbekämpfung keine Quantifizierung der Erreger der Rindertuberkulose nötig ist und das Ergebnis pro Einzeltier die wichtigste epidemiologische Einheit darstellt, wird ein Rind als bTB-positiv angesehen, wenn auch nur in einer der elf untersuchten Organproben mykobakterielle DNA mittels real-time PCR nachgewiesen wurde und/oder durch kulturelle Isolation und Differenzierung, *M. bovis* oder *M. caprae* identifiziert wurde. Es reicht lediglich eine Ja/Nein-Aussage um eine bovine Tuberkulose als anzeigepflichtige Tierseuche zu bestätigen.

Da die Kultur nur aus lebenden Organismen angelegt werden kann, der Nachweis der DNA allerdings aus lebenden und toten Organismen möglich ist und per Definition in der Rindertuberkulose-Verordnung einer dieser beiden Nachweisverfahren als beweisend für eine bovine Tuberkulose gilt und amtliche Kontrollen nach sich zieht, wurde im Rahmen dieser Studie der molekularbiologische Nachweis als der schnellste und wichtigste in der staatlichen Tierseuchenbekämpfung angesehen. Zusätzlich können durch den molekularbiologischen Nachweis falsch-negative Ergebnisse in der Kultur durch nicht mehr vermehrungsfähige Erreger ausgeschlossen werden. Daher wurde im Rahmen der staatlichen Untersuchung von jeder der vorgeschriebenen elf Organproben eine DNA Extraktion mit anschließender real-time PCR durchgeführt, jedoch nur bei verdächtigen Organen oder sichtbaren Läsionen zusätzlich eine Kultur angelegt. Die Kultur als Goldstandard konnte somit nicht ergänzend zu jeder mittels real-

time PCR untersuchten Probe durchgeführt werden. Daraus ergab sich, dass eine Berechnung der Sensitivität und Spezifität der neuen Extraktionsverfahren im Rahmen dieser Studie nicht erfolgen konnte.

Somit wurden in der durchgeführten Studie die drei Extraktionsmethoden direkt anhand der resultierenden C_t -Werte miteinander verglichen. Diese Entscheidung gründete sich darauf, dass das Anlegen von Kulturen aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der Originalproben nicht immer möglich war und dass das Anlegen von Kulturen aus allen für die Studien verwendeten Feldproben zeit-, kostenintensiv und logistisch aufgrund des Fehlens eines BSL3 Labors arbeitstechnisch nicht durchführbar gewesen wäre.

Der direkte Vergleich der Extraktionsmethoden geschah zunächst auf Ebene eines direkten Vergleiches der C_t -Werte der einzelnen mittels der drei Extraktionsverfahren untersuchten Proben und auf einer weiterführenden zweiten Ebene, über die Berechnung des Kappa-Wertes als statistisches Mittel auf Ebene des Ergebnisses pro Einzeltier.

Insgesamt kann durch den direkten Vergleich der drei Extraktionsmethoden eine Aussage über eine Verbesserung oder Verschlechterung des MTC-DNA Nachweises aus Gewebeproben von Rind und Rotwild getroffen werden. Dafür eignen sich besonders die im Zuge der Studie gemessenen C_t -Werte. Ein niedrigerer C_t -Wert in einem der neuen Protokolle oder gar das Vorhandensein von Fluoreszenzsignalen für MTC-DNA im Gegensatz zum amtlichen Protokoll, in dem keine Signale für MTC-DNA generiert wurden, spricht zum einen für eine höhere Anzahl der nachzuweisenden Organismen in der Gewebeprobe, da ein größeres Probenvolumen verwendet wurde. Zum anderen spricht es auf jeden Fall für eine frühere Detektion und daher eine effizientere DNA Extraktion aus den Mykobakterien. Außerdem spricht eine Erhöhung der C_t -Werte für β -Aktin, was insbesondere beim MC Verfahren erreicht wurde, für eine deutliche Verminderung irrelevanter DNA des Wirts in der Gewebeprobe.

5 Verbesserung der Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* mittels real-time PCR

Aufgrund der in der Studie von Domogalla et al. nachgewiesenen Heterogenität in der RD4-Sequenz alpiner *M.-caprae*-Isolate ist eine sichere Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* anhand einer fehlenden RD4-Sequenz bei *M. bovis* nicht sicher möglich (DOMOGALLA, 2014b). Die zur Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* verwendeten real-time PCRs aus der amtlichen Methodensammlung des FLI beruhen allerdings auf dem Nachweis der RD4-Deletion im Genom von *M. bovis* (TAYLOR et al., 2007a; FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015). Die zur Differenzierung verwendeten Primer in der amtlichen Methodensammlung flankieren dabei die RD4-Deletion im Genom von *M. bovis*. Die Verwendung dieser Primer lieferten zum Zeitpunkt der Studie von Domogalla et al. keine falschen Ergebnisse in Bezug auf die bekannten RD4-Variationen bei *M. caprae* und der Differenzierung der beiden Rindertuberkulose-Erreger. Jedoch können zum jetzigen Zeitpunkt zusätzliche RD4-Variationen nicht ausgeschlossen werden und diese könnten somit zu einer falschen *M. bovis* Differenzierung führen (DOMOGALLA, 2014b). Allerdings wird in der aktuellen Fassung der Amtlichen Methodensammlung bereits darauf hingewiesen, dass es Einschränkung hinsichtlich eines *M.-caprae*-Genotypes gibt, der in Bayern nachgewiesen wurde und sich durch die RD4-PCR nicht von *M. bovis* unterscheiden lässt (FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT, 2015).

Für die Identifikation von *M. caprae* wird eine modifizierte Sonden aus einer Studie von Reddington et al. empfohlen, die einen *M.-caprae*-spezifischen SNP detektiert (REDDINGTON et al., 2011). Jedoch zeigte sich während der real-time PCR-Differenzierung der Feldproben, dass auch *M. bovis* BCG, der bei als Positivkontrolle für MTC-DNA eingesetzt wurde, ebenfalls unter Verwendung der eigentlich als *M.-caprae*-spezifischen Sonde als eindeutig *M.-caprae*-positiv erkannt wurde (C_t -Werte um 25, siehe Abbildungen A 3, A 4). Dabei fiel eine veränderte Amplitude auf. Der verwendete *M. bovis* BCG-Stamm wurde daraufhin im Hain-Test wiederholt untersucht um eine Kontamination mit *M. caprae* auszuschließen und konnte eindeutig als *M. bovis* BCG bestätigt werden. Danach wurden weitere Versuche im Hinblick auf die Verwendung verschiedener Mastermixe, Thermoprofile und real-time-PCR-Cycler gemacht, das Problem blieb jedoch bestehen.

Die Lösung des Problems stellte letztendlich eine LNA (locked nucleic acids)-Sonde dar. LNA Moleküle gehören zu einer Klasse von hochaffinen RNA-Analoga (Abbildung 15), in denen der Ribose-Ring ideal für die Konformation der Watson-Crick-Bindungen ausgelegt ist.

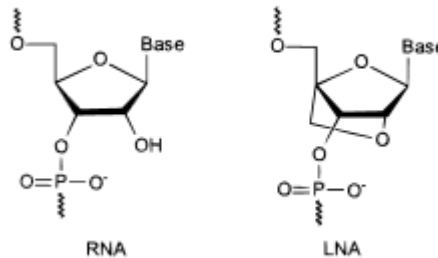


Abbildung 15: Struktur von RNA und LNA im Vergleich

Modifiziert nach Koshkin et al. (KOSHKIN et al., 1998)

Diese besondere Struktur der LNA Oligonukleotide führt zu einer hohen thermischen Stabilität, wenn sie an einen komplementären DNA- oder RNA-Strang hybridisiert. Außerdem können LNA-Oligonukleotid-Sequenzen kürzer als DNA-/RNA-Oligonukleotid-Sequenzen hergestellt werden und dabei gleichzeitig ihre Thermostabilität behalten. Dies ist ein wichtiger Punkt bei der Detektion von nur kleinen oder sehr ähnlichen Zielsequenzen (KOSHKIN et al., 1998; JEPSEN et al., 2004).

Da die in unserer Studie zur Differenzierung von *M. caprae* verwendete Sonde nur einen einzigen SNP zweier sonst identischer Zielsequenzen identifizieren muss, um *M. bovis* und *M. caprae* zu unterscheiden, bietet der Einsatz einer LNA-Sonde im Gegensatz zu einer herkömmlichen Sonde einen Vorteil durch die gesteigerte Spezifität im Hinblick auf die Detektion von sehr ähnlichen Zielsequenzen. Dies zeigte sich auch in den Ergebnissen unserer Studie, in denen DNA Extrakte aus Reinkulturen von *M. bovis* und *M. bovis* BCG unter Verwendung einer neu designten *M.-caprae*-spezifischen LNA Sonde nicht mehr fälschlicherweise als *M. caprae* detektiert wurden (siehe Tabelle A 2).

6 Ausblick

Die Verwendung des etablierten Magnetic Capture Verfahrens könnte auch in Zukunft helfen, inhomogen verteilte Erreger mit einer höheren Wahrscheinlichkeit aus größeren Probenvolumina nachzuweisen. Dabei ist nicht nur ein Nachweis aus Gewebeproben möglich, sondern auch bei einem Nachweis von Erregern aus Kot könnte das Protokoll von Nutzen sein. Beispielsweise beim Nachweis für Mitglieder des *Mycobacterium-avium*-Komplexes mittels PCR wäre eine selektive Voranreicherung der Erreger-DNA von Vorteil, um die große Last von denen im Kot enthaltenen Inhibitoren zu reduzieren (SEVILLA et al., 2014). Bezüglich dieses Erregers wird auch bereits die IMS bei humanen Kotproben eingesetzt (LI et al., 1996) und auch aus tierischen Kotproben werden Nukleinsäuren mittels magnetischer Separation selektiv vorangereicht (PLAIN et al., 2015). Allerdings geschieht dies in den bekannten Studien noch immer aus sehr kleinen Probenvolumina (200 µl Reinkultur). Auch diese Art der Beprobung wird der besonderen Pathogenese einer mykobakteriellen Infektion noch nicht gerecht, da *M. avium* subsp. *paratuberculosis* von Rindern, die die Infektion unter Kontrolle haben, nur intermittierend über den Kot ausgeschieden wird und erst in späten Infektionsstadien der Erreger in großer Zahl im Kot nachgewiesen werden kann (MITCHELL et al., 2015). Daher könnte man sich das vergrößerte Probenvolumen unserer Methode dazu zu Nutzen machen, Pool-Proben von verdächtigen Tieren oder von Tieren aus verdächtigen Beständen zu untersuchen.

Des Weiteren ergibt sich aus dem Einsatz eines größeren Probenvolumens die Möglichkeit einer Reduzierung der laut Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes vorgeschriebenen elf zu testenden Proben pro Tier. Beispielsweise könnten die für eine Rindertuberkulose-verdächtigen Organe wie Lungenlymphknoten, Darmlymphknoten oder Teile der Lunge als Einzelproben untersucht werden und die restlichen vorgeschriebenen Organe (Leber, Niere, Milz, Darm und assoziierte Lymphknoten), in denen ein MTC-DNA-Nachweis eher in der bereits generalisierten Form der Rindertuberkulose als in frühen Infektionsstadien wahrscheinlich ist, als Pool-Probe untersucht werden.

Generell ist es möglich, durch das Design Spezies-spezifischer Capture-Oligonukleotidsequenzen die Spezifität an jedes Mitglied des MTC anzupassen. So könnte eine Spezies-Differenzierung direkt aus der Probe ermöglicht werden und damit könnte die zweite real-time PCR, wie sie zur Zeit in der amtlichen

Methodensammlung für die Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* vorgeschlagen wird, eingespart werden, was die Zeit bis zu einem Ergebnis noch weiter reduziert. Dies ist besonders wichtig, wenn es um den Nachweis einer anzeigepflichtigen Tierseuche geht, um möglichst schnell Maßnahmen zur Einschränkung der Tierseuche zu ergreifen. Allerdings wäre dazu eine Gesamtgenomsequenzierung weiterer *M.-bovis*- und *M.-caprae*-Isolate nötig, um über eine molekularbiologische Feincharakterisierung spezifische Capture-Sequenzen zu entwickeln.

Aktuelle Studien beschäftigten sich mit dem Nachweis von MTC-Mitgliedern aus dem Blut von im Hauttest positiv getesteten Rindern und konnten über die Etablierung eines Bakteriophagen-basierenden Anreicherungsprotokolls (engl.: bacteriophage-based method combined with PCR, phage-PCR) lebende Mykobakterien aus dem peripheren Blut sicher nachweisen (SWIFT et al., 2016). Da dieser Nachweis allerdings auf lebende Organismen beschränkt ist, würde sich in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung des peripheren Blutes von im Hauttest positiven Rindern mittels Nukleinsäuren-MCH-Verfahren anbieten, da mit diesem Verfahren zusätzlich zu den lebenden auch nicht mehr lebende Organismen nachgewiesen werden können, was potentiell zu einer weiteren Steigerung der Detektionswahrscheinlichkeit für bovine Tuberkulose bei Rindern führen könnte.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Rindertuberkulose stellt auch heutzutage noch ein weltweit vorkommendes Problem dar und führt nicht nur zu volkswirtschaftlichen Schäden, sondern auch zu einer verminderten Tiergesundheit, Produktionseinbußen und zu hohen Kosten durch erforderliche Bekämpfungsmaßnahmen zum Schutz von Mensch und Tier. Obwohl Deutschland seit 1996 offiziell frei von Rindertuberkulose ist, treten in Rinderbeständen und beim Rotwild immer wieder vereinzelt Fälle der bovinen Tuberkulose auf, insbesondere in der bayrischen Alpenregion, in der ein Großteil der dort gehaltenen Rinder auf Sommerweiden aufgetrieben wird und ebendort ein Erregeraustausch zwischen dem als Wildtierreservoir angesehenem Rotwild und dem Rind stattfinden kann. Die bTB-Fälle im süddeutschen Raum bei Rind und Rotwild sind fast ausschließlich auf den Erreger *M. caprae* zurückzuführen, *M. bovis* wird eher in norddeutschen Raum isoliert. Auch in den angrenzenden Alpenländern Österreich und Italien konnten *M.-caprae*-Infektionen im Rotwild in den letzten Jahren nachgewiesen werden, was eine Erregerübertragung zwischen Rind und Rotwild in der Alpenregion nahelegt.

Die durch die Rindertuberkulose-Verordnung vorgeschriebenen diagnostischen Möglichkeiten sind durch die besondere Pathogenese der Infektion mit den Erregern der Rindertuberkulose begrenzt. Um dieser Problematik gerecht zu werden und die Erreger aus Gewebeproben besser nachweisen zu können, wurden zwei alternative DNA Extraktionsprotokolle zur DNA Extraktion aus großen Gewebeproben von Rind und Rotwild entwickelt. Diese ermöglichen eine effizientere DNA Extraktion aus einem um ein Vielfaches größeren Probenvolumens im Gegensatz zur derzeit verwendeten, amtlichen Methode. Dazu wurden zunächst die Protokolle durch Vorversuche mit artifiziell mit *M. bovis* BCG beimpften Lymphknoten etabliert. Dabei zeigte besonders das Magnetic-Capture-Extraktionsverfahren vielversprechende Ergebnisse, die durch eine effiziente Lyse der Gewebeprobe inklusive Bakterien und die spezifische Anreicherung von MTC-DNA mittels der magnetischen Separation von Nukleinsäuren erreicht wurden. Diese Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung von 100 Feldproben von bTB-verdächtigen Rindern und Rotwild bestätigt werden und konnten im Vergleich zum amtlichen Protokoll mehr Organproben (n = 5) als MTC-positiv identifizieren und somit die Wahrschein-

lichkeit eines MTC-DNA Nachweises aus Gewebeproben steigern. Da das Verfahren jedoch relativ zeit- und kostenintensiv ist, ist es nicht uneingeschränkt für die Routinediagnostik zu empfehlen. Daher wurde ein zweites Extraktionsprotokoll entwickelt, das ebenfalls aus großen Gewebevolumina effizient DNA extrahiert, allerdings in der Anwendung einfacher und schneller ist und somit in die Routinediagnostik im Rahmen der staatlichen Tierseuchenbekämpfung integriert werden kann. Auch dieses Protokoll konnte aus einem Probenpool von 49 Organproben mehr Proben ($n = 5$) im Vergleich zur amtlichen Methode als MTC-positiv identifizieren und trägt zu einer höheren Detektionswahrscheinlichkeit der Erreger bei. In dieser Studie konnte durch den direkten Vergleich der real-time PCR Ergebnisse der beiden neuen Extraktionsprotokolle mit denen der amtlich verwendeten Methode gezeigt werden, dass die beiden neu etablierten Extraktionsprotokolle zuverlässig und spezifisch MTC-DNA aus großen Probenvolumina nachweisen können, was die Detektionsrate von mykobakterieller DNA im Vergleich zu den sonst verwendeten sehr kleinen Probenvolumen erhöht. Das Magnetic-Capture-Verfahren stellt eine robuste und hochempfindliche Methode zum spezifischen MTC-DNA-Nachweis aus größeren Gewebemassen dar und kann insbesondere bei autolytischen Proben mit einer großen Anzahl von Inhibitoren verwendet werden, oder wenn nur eine minimale bakterielle Belastung im Gewebe (non visible lesions) zu erwarten ist. Für die tägliche Routinediagnostik kann das vereinfachte Verfahren bei großer Probenanzahl und -masse empfohlen werden, da es in kürzerer Zeit und mit weniger Aufwand durchgeführt werden kann.

VI SUMMARY

Bovine tuberculosis is still a global problem and leads to economic losses, decreased animal health and welfare, production losses and high costs because of control measures for the protection of humans and animals. Although Germany is declared officially tuberculosis-free since 1996, cases of bovine tuberculosis in cattle and red deer occur consistently, in particular in the Bavarian Alps. The Bavarian alpine region is an area with plenty of cattle summer pastures. Cattle on these summer pastures can get infected by infected red deer, which is considered to be a reservoir host for bTB. While bTB in the southern parts of Germany is almost exclusively caused by the pathogen *M. caprae*, bTb in the northern parts of Germany is usually caused by *M.-bovis*-infections. In addition, *M.-caprae*-infections in red deer were detected in neighboring Alpine countries such as Austria and Italy in recent years, suggesting a pathogen transmission between red deer and cattle in the Alpine region.

The prescribed diagnostic protocols in the framework of the government guided animal disease control lack refinement and are limited by the particular pathogenesis of bTB. To address these issues and to improve the diagnostics of bTB in tissue samples, two alternative DNA extraction methods have been developed for DNA extraction from larger tissue samples from cattle and red deer. These methods allow a more efficient DNA extraction from larger sample volumes compared to the currently prescribed DNA extraction method. The protocols have been established by preliminary tests with artificially spiked lymph nodes with *M. bovis* BCG. Particularly the MC method showed promising results that have been achieved by an efficient lysis of the tissue sample including the bacteria and specific enrichment of MTC DNA by means of magnetic separation of nucleic acids. These findings were also confirmed by testing 100 field samples collected from bTB suspicious cattle and red deer. With the magnetic capture protocol we were able to identify five additional tissue samples as MTC-positive compared to the currently prescribed protocol and could therefore increase the likelihood of MTC DNA detection in tissue samples by using the new extraction protocol. However, the process of magnetic capture is time consuming and hence expensive and is not fully recommended for the use in routine diagnostics. Thus, a second extraction protocol was developed to efficiently extract DNA from large

tissue volumes, which is easier and faster in its application and can therefore be implemented in daily routine diagnostics in the framework of government disease control. In comparison to the current used protocol we identified four additional samples as MTC-positive by using this protocol. Consequently, this protocol also increases efficiently the likelihood of MTC DNA detection in animal tissue.

By direct comparison of the real-time PCR results of the current used protocol with the results generated with the two newly established DNA extraction methods, it was shown that the two newly established DNA extraction methods generate reliable results and increased the detection rate of MTC DNA from animal tissue samples. The magnetic capture method provides a robust and highly sensitive method for specific MTC DNA detection from larger tissue volumes and can be used in particular with autolytic samples with a large amount of inhibitors or in samples, in which only minimal bacterial load (non visible lesion samples) is expected. For daily routine diagnostics the simplified DNA extraction method can be used on larger tissue samples as it can be done faster and with less effort.

VII LITERATURVERZEICHNIS

Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis 2010; 16: 1296-9.

Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Lett Appl Microbiol 2008; 47: 8-11.

Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, Vordermeier M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. Clinical and Vaccine Immunology 2007; 14: 1356-61.

Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. The Lancet 2000; 356: 1099-104.

Angkawanish T, Wajjwalku W, Sirimalaisuwan A, Mahasawangkul S, Kaewsakhorn T, Boonsri K, Rutten VP. *Mycobacterium tuberculosis* infection of domesticated Asian elephants, Thailand. Emerg Infect Dis 2010; 16: 1949-51.

Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G, Domínguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol 1999; 49 Pt 3: 1263-73.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53: 1785-9.

Aranaz A, De Juan L, Montero N, Sánchez C, Galka M, Delso C, Álvarez J, Romero B, Bezos J, Vela AI, Briones V, Mateos A, Domínguez L. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. J Clin Microbiol 2004; 42: 2602-8.

Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J Exp Med 1975; 142: 1-16.

Asselineau J, Lederer E. Structure of the Mycolic Acids of Mycobacteria. Nature 1950; 166: 782-3.

Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh FK, Chalut C, Lopez A, Guilhot C. Phthiocerol dimycocerosates of *M. tuberculosis* participate in macrophage invasion by inducing changes in the organization of plasma membrane lipids. PLoS Pathog 2009; 5: e1000289.

Barbier E, Chantemesse B, Rochelet M, Fayolle L, Bollache L, Boschirolu ML, Hartmann A. Rapid dissemination of *Mycobacterium bovis* from cattle dung to soil by the earthworm *Lumbricus terrestris*. Vet Microbiol 2016; 186: 1-7.

Barry CE, 3rd, Mdluli K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. Trends Microbiol 1996; 4: 275-81.

Behr MA, Small PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. Vaccine 1999; 17: 915-22.

Berg JW. The dual nature of acid-fastness. Yale J Biol Med 1953; 26: 215-23.

Bezos J, de Juan L, Romero B, Álvarez J, Mazzucchelli F, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Vet Immunol Immunopathol* 2010; 133: 269-75.

Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, Lopez L, Rueda P, Dominguez L. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014;

Blaas SH, Böhm S, Martin G, Erler W, Glück T, Lehn N, Naumann L. Pericarditis as primary manifestation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 431-3.

Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1751-9.

Boniotti MB, Gorla M, Loda D, Garrone A, Benedetto A, Mondo A, Tisato E, Zanoni M, Zoppi S, Dondo A, Tagliabue S, Bonora S, Zanardi G, Pacciarini ML. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 636-44.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)* 2003; 83: 98-106.

Bose M, Chander A, Das RH. A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 2529-30.

Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE. IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000; 105: 1317-25.

Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annual review of biochemistry* 1995; 64: 29-63.

Brodhun B, Altmann D, Hauer B, Fiebig L, Haas W (2015) Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2014. Robert Koch-Institut, Berlin

Broeckl S, Krebs S, Varadharajan A, Straubinger RK, Blum H, Buettner M. Investigation of intra-herd spread of *Mycobacterium caprae* in cattle by generation and use of a whole-genome sequence. *Vet Res Commun* 2017;

Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *International Journal of Medical Microbiology* 2000; 290: 143-52.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3684-9.

Buddle BM, de Lisle GW, Pfeffer A, Aldwell FE. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995; 13: 1123-30.

Cardoso MA, Cardoso RF, Hirata RD, Hirata MH, Leite CQ, Santos AC, Siqueira VL, Okano W, Rocha NS, Lonardoni MV. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoonoses Public Health* 2009; 56: 465-70.

Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. J Comp Pathol 1999; 121: 321-37.

Cassidy JP, Bryson DG, Gutiérrez Cancela MM, Forster F, Pollock JM, Neill SD. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. J Comp Pathol 2001; 124: 46-51.

Cassidy JP. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. Vet Microbiol 2006; 112: 151-61.

Castets M, Boisvert H, Grumbach F, Brunel M, Rist N. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. Rev Tuberc Pneumol (Paris) 1968; 32: 179-84.

Castets M, Rist N, Boisvert H. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. Med Afr Noire 1969; 16: 321-2.

Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect Immun 1991; 59: 1755-61.

Cheng N, Porter MA, Frick LW, Nguyen Y, Hayden JD, Young EF, Braunstein MS, Hull-Ryde EA, Janzen WP. Filtration improves the performance of a high-throughput screen for anti-mycobacterial compounds. PLoS One 2014; 9: e96348.

Claridge J, Diggle P, McCann CM, Mulcahy G, Flynn R, McNair J, Strain S, Welsh M, Baylis M, Williams DJ. *Fasciola hepatica* is associated with the failure to detect bovine tuberculosis in dairy cattle. Nat Commun 2012; 3: 853.

Clemens DL, Horwitz MA. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. J Exp Med 1995; 181: 257-70.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393: 537-44.

Cole ST. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 2002; 148: 2919-28.

Collins DM, De Lisle GW. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. J Clin Microbiol 1985; 21: 562-4.

Collins DM, Stephens DM. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol Lett 1991; 67: 11-5.

Cook HC. Origins of tinctorial methods in histology. J Clin Pathol 1997; 50: 716-20.

Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. Aust Vet J 1990; 67: 389-92.

Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microbiol 1994; 40: 53-63.

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 59-70.

Costello E, Egan JW, Quigley FC, O'Reilly PF. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet Rec* 1997; 141: 222-4.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 1305-14.

DAHW. Deutsche Lepra- und Tuberkulosehilfe e.V., <http://www.dahw.de/lepra-tuberkulose-buruli/lepra/4-mikrobiologie>. 2016: <http://www.dahw.de/lepra-tuberkulose-buruli/lepra/4-mikrobiologie>. 06.08.2016.

de la Fuente J, Díez-Delgado I, Contreras M, Vicente J, Cabezas-Cruz A, Manrique M, Tobes R, López V, Romero B, Domínguez L, Garrido JM, Juste R, Gortazar C. Complete Genome Sequences of Field Isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Genome Announc* 2015; 3

de la Rua-Domenech R, Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci* 2006; 81: 190-210.

de Lisle GW, Havill PF. Mycobacteria isolated from deer in New Zealand from 1970-1983. *N Z Vet J* 1985; 33: 138-40.

de Vallière S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun* 2005; 73: 6711-20.

Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun* 2005; 73: 6467-71.

Delahay RJ, Cheeseman CL, Clifton-Hadley RS. Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the European badger (*Meles meles*) and other British mammals. *Tuberculosis (Edinb)* 2001; 81: 43-9.

Derrick SC, Morris SL. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1547-55.

Diel R, Loytved G, Nienhaus A, Castell S, Detjen A, Geerdes-Fenge H, Haas W, Hauer B, Königstein B, Maffei D, Magdorf K, Priwitzer M, Zellweger JP, Loddenkemper R. New recommendations for contact tracing in tuberculosis. German Central Committee against Tuberculosis. *Pneumologie* 2011; 65: 359-78.

Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM, Fortune S, Behar SM, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol* 2009; 10: 899-906.

Dlugovitzky D, Bay ML, Ratani L, Fiorenza G, Vietti L, Farroni MA, Bottasso OA. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 343-9.

Domingo M, Vidal E, Marco A. Pathology of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 2014; 97 Suppl: S20-9.

Domogalla J, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Gellert S, Müller M, Neuendorf E, Sedlmaier F, Büttner M. Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. J Clin Microbiol 2013; 51: 1381-8.

Domogalla J (2014a) Subtypisierung bayerischer *Mycobacterium caprae* Isolate aus Wild- und Nutztier mittels der genetischen Variation in der Region of difference four (RD4). In: Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ludwig-Maximilians-Universität München, München. 78, S. 9

Domogalla J (2014b) Subtypisierung bayerischer *Mycobacterium caprae* Isolate aus Wild- und Nutztier mittels der genetischen Variation in der Region of difference four (RD4). In: Veterinärwissenschaftliches Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Ludwig-Maximilians-Universität München, München. 78, S. 39-43

Dondo A, Zoppi S, Rossi F, Chiavacci L, Barbaro A, Garrone A, Benedetto A, Goria M. Mycobacteriosis in wild boar: results of 2000–2006 activity in North-Western Italy. Epidémiologie et santé animale 2007; 51: 35-42.

Dormer BA, Martinaglia G, Hobbs WB. INH prophylaxis and treatment in bovines. S Afr Med J 1961; 35: 429-31.

El-Sayed A, El-Shannat S, Kamel M, Castañeda-Vazquez MA, Castañeda-Vazquez H. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. Zoonoses Public Health 2015;

Erlor W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J, Bartos M, Nagy G, Cvetnic Z, Zolnir-Dovc M, Pavlik I. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from central Europe. J Clin Microbiol 2004; 42: 2234-8.

Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1998; 66: 1277-81.

Evangelista TBR, De Anda JH. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium* spp. exposure associated with management of colostrum and milk. Preventive Veterinary Medicine 1996; 27: 23-7.

Faye S, Moyon JL, Gares H, Benet JJ, Garin-Bastuji B, Boschioli ML. Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFNgamma assay (Bovigam®) in a low prevalence area in France. Vet Microbiol 2011; 151: 60-7.

Fine AE, Bolin CA, Gardiner JC, Kaneene JB. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. Vet Med Int 2011; 2011: 765430.

Fink M, Schleicher C, Gonano M, Prodingen WM, Pacciarini M, Glawischnig W, Ryser-Degiorgis MP, Walzer C, Stalder GL, Lombardo D, Schobesberger H, Winter P, Büttner M. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. Emerg Infect Dis 2015; 21: 464-7.

Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. Infect Immun 2001; 69: 4195-201.

Forrellad MA, Klepp LI, Gioffré A, Sabio y García J, Morbidoni HR, de la Paz Santangelo M, Cataldi AA, Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Virulence 2013; 4: 3-66.

Francis J. Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology. Tuberculosis in Animals and Man. A Study in Comparative Pathology. 1958;

Friedrich-Loeffler-Institut BfT (2014) Tiergesundheitsjahresbericht 2014, Greifswald - Insel Riems

Friedrich-Loeffler-Institut IfMP. Amtliche Methodensammlung : Anzeigepflichtige Tierseuchen : Tuberkulose der Rinder (*Mykobakterium bovis* und *Mykobakterium caprae*). 2015;

Fritsche A, Engel R, Buhl D, Zellweger JP. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. Int J Tuberc Lung Dis 2004; 8: 903-4.

Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. Nat Immunol 2008; 9: 1189-97.

García-Jiménez WL, Fernández-Llario P, Gómez L, Benítez-Medina JM, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Gough J, Ortiz-Peláez A, Smith NH, Hermoso de Mendoza J, Salguero FJ. Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected fallow deer (*Dama dama*). Vet Immunol Immunopathol 2012; 149: 66-75.

Garcia Pelayo MC, Uplekar S, Keniry A, Mendoza Lopez P, Garnier T, Nunez Garcia J, Boschioli L, Zhou X, Parkhill J, Smith N, Hewinson RG, Cole ST, Gordon SV. A comprehensive survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across *Mycobacterium bovis* strains and *M. bovis* BCG vaccine strains refines the genealogy and defines a minimal set of SNPs that separate virulent *M. bovis* strains and *M. bovis* BCG strains. Infect Immun 2009; 77: 2230-8.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 7877-82.

Gerstmair E (2011a) Validierung molekularbiologischer und immunologischer Nachweisverfahren für die Tuberkulose bei Rindern und Tuberkulosemonitoring beim Rotwild. Ludwig-Maximilians-Universität, München. 135 p., p. 15

Gerstmair E (2011b) Validierung molekularbiologischer und immunologischer Nachweisverfahren für die Tuberkulose bei Rindern und Tuberkulosemonitoring beim Rotwild. Ludwig-Maximilians-Universität, München. 135 p., pp. 6-7

Ghodbane R, Mba Medie F, Lepidi H, Nappez C, Drancourt M. Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology* 2014; 160: 496-501.

Gonzalez-y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S, Colston MJ, Cox RA. Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol* 1997; 179: 6949-58.

Good M, Clegg TA, Murphy F, More SJ. The comparative performance of the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations from different manufacturers. *Veterinary Microbiology* 2011; 151: 77-84.

Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999; 32: 643-55.

Goren MB, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 2510-4.

Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol* 2006; 112: 171-9.

Greenwald R, Lyashchenko O, Esfandiari J, Miller M, Mikota S, Olsen JH, Ball R, Dumonceaux G, Schmitt D, Moller T, Payeur JB, Harris B, Sofranko D, Waters WR, Lyashchenko KP. Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. Clin Vaccine Immunol 2009; 16: 605-12.

Guérin C, Rosenthal SR. The history of BCG: early history. In: Rosenthal SR (Ed) BCG vaccination against tuberculosis; Boston: Little, Brown & Co 1957: pp. 48-57.

Harrington R, Jr., Karlson AG. Destruction of Various Kinds of Mycobacteria in Milk by Pasteurization. Appl Microbiol 1965; 13: 494-5.

Health EPoA, Welfare. Scientific Opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. EFSA Journal 2012; 10: n/a-n/a.

Hein WR, Mackay CR. Prominence of $\gamma\delta$ T cells in the ruminant immune system. Immunology today 1991; 12: 30-4.

Hiko A, Agga GE. First-time detection of mycobacterium species from goats in Ethiopia. Trop Anim Health Prod 2011; 43: 133-9.

Hmama Z, Peña-Díaz S, Joseph S, Av-Gay Y. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. Immunol Rev 2015; 264: 220-32.

Holani AG, Ganvir SM, Shah NN, Bansode SC, Shende I, Jawade R, Bijjargi SC. Demonstration of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum and saliva smears of tuberculosis patients using ziehl neelsen and flurochrome staining- a comparative study. J Clin Diagn Res 2014; 8: Zc42-5.

Hosek J, Svastova P, Moravkova M, Pavlik I, Bartos M. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. Veterinarni medicina 2006; 51: 180-92.

Howe RP, Reeve MA, Bischof D. Magnetic separation method. Google Patents 1999: <https://www.google.com/patents/US5897783>. 17.10.1995.

Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. J Clin Microbiol 2003; 41: 1637-50.

Huard RC, Fabre M, de Haas P, Lazzarini LC, van Soolingen D, Cousins D, Ho JL. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Bacteriol 2006; 188: 4271-87.

Hunter RL, Olsen M, Jagannath C, Actor JK. Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice. Am J Pathol 2006; 168: 1249-61.

Hurley SS, Splitter GA, Welch RA. Rapid lysis technique for mycobacterial species. J Clin Microbiol 1987; 25: 2227-9.

Indrigo J, Hunter RL, Jr., Actor JK. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. Microbiology 2003; 149: 2049-59.

Intorasoot S, Tharinjaroen CS, Phunpae P, Butr-Indr B, Anukool U, Intachai K, Orrapin S, Apiratmateekul N, Arunothong S, Suthachai V, Saengsawang K, Khamnoi P, Pata S, Kasinrerak W, Tragoolpua K. Novel potential diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis* complex using combined immunomagnetic separation (IMS) and PCR-CTPP. J Appl Microbiol 2016; 121: 528-38.

Isaksson M, Hagström Å, Armua-Fernandez MT, Wahlström H, Ågren EO, Miller A, Holmberg A, Lukacs M, Casulli A, Deplazes P, Juremalm M. A semi-automated magnetic capture probe based DNA extraction and real-time PCR method applied in the Swedish surveillance of *Echinococcus multilocularis* in red fox (*Vulpes vulpes*) faecal samples. Parasit Vectors 2014; 7: 583.

Jenkins AO, Cadmus SI, Venter EH, Pourcel C, Hauk Y, Vergnaud G, Godfroid J. Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. Vet Microbiol 2011; 151: 139-47.

Jepsen JS, Sørensen MD, Wengel J. Locked nucleic acid: a potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology. Oligonucleotides 2004; 14: 130-46.

Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. Int J Syst Bacteriol 1970; 20: 273-82.

Kaufmann SHE. Tuberkulose: Forschung über eine vergessene, aber nicht vergangene Krankheit. In: Jahrbuch der Max-Planck Gesellschaft, Forschungsbericht 2011. Max-Planck-Gesellschaft M, ed.: Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Abteilung Immunologie 2011:

Keck N, Dutruel H, Smyej F, Nodet M, Boschirolu ML. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in a Camargue horse. Vet Rec 2010; 166: 499-500.

Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LAB, Netea MG, Van Crevel R. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical and Developmental Immunology 2011; 2011: 405310.

Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose. Berliner Klinische Wochenschrift 1882; 19 (1882)

Köhler H, Hoffmann B, Moser I, Möbius P (2010) Novel probe-based real-time PCR for rapid diagnosis of bovine tuberculosis in tissue samples with suspect lesions. In: Poster auf der Tagung der DVG-FG Bakteriologie und Mykologie vom 22.06. bis 24.06.2010, Jena

Koshkin AA, Nielsen P, Meldgaard M, Rajwanshi VK, Singh SK, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): an RNA mimic forming exceedingly stable LNA: LNA duplexes. J Am Chem Soc 1998; 120: 13252-3.

Kubica T, Rüsch-Gerdes S, Niemann S. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J Clin Microbiol 2003; 41: 3070-7.

Lantos A, Niemann S, Mezösi L, Sós E, Erdélyi K, Dávid S, Parsons LM, Kubica T, Rüsch-Gerdes S, Somoskövi A. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. Emerg Infect Dis 2003; 9: 1462-4.

Lee IS, Lee N, Park J, Kim BH, Yi YW, Kim T, Kim TK, Lee IH, Paik SR, Hyeon T. Ni/NiO core/shell nanoparticles for selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins. J Am Chem Soc 2006; 128: 10658-9.

Lee J, Hartman M, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. Yonsei medical journal 2009; 50: 1-11.

Lehmann KB, Neumann RO (1896) Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik.

Lepper AW, Corner LA, Pearson CW. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. Aust Vet J 1977; 53: 301-5.

Lévy-Frébault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 315-23.

Li Z, Bai GH, von Reyn CF, Marino P, Brennan MJ, Gine N, Morris SL. Rapid detection of *Mycobacterium avium* in stool samples from AIDS patients by immunomagnetic PCR. J Clin Microbiol 1996; 34: 1903-7.

Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 33-6.

Liu J, Barry CE, 3rd, Besra GS, Nikaido H. Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. J Biol Chem 1996; 271: 29545-51.

Mangiapan G, Vokurka M, Schouls L, Cadranel J, Lecossier D, van Embden J, Hance AJ. Sequence capture-PCR improves detection of mycobacterial DNA in clinical specimens. J Clin Microbiol 1996; 34: 1209-15.

McCorry T, Whelan AO, Welsh MD, McNair J, Walton E, Bryson DG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Pollock JM. Shedding of *Mycobacterium bovis* in the nasal mucus of cattle infected experimentally with tuberculosis by the intranasal and intratracheal routes. Vet Rec 2005; 157: 613-8.

McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Infect Immun 1993; 61: 2763-73.

McNair J, Corbett DM, Girvin RM, Mackie DP, Pollock JM. Characterization of the early antibody response in bovine tuberculosis: MPB83 is an early target with diagnostic potential. Scand J Immunol 2001; 53: 365-71.

Medeiros L, Marassi CD, Figueiredo EE, Lilenbaum W. Potential application of new diagnostic methods for controlling bovine tuberculosis in Brazil. *Braz J Microbiol* 2010; 41: 531-41.

Menge C, Köhler H, Moser I, Conraths FJ, Homeier T. Nationwide Cross-Sectional Study on Bovine Tuberculosis by Intra Vitam Testing in Germany, 2013-2014. *Transbound Emerg Dis* 2016;

Menin A, Fleith R, Reck C, Marlow M, Fernandes P, Pilati C, Báfica A. Asymptomatic cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis* present exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. *PLoS One* 2013; 8: e53884.

Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000; 160: 92-106.

Michel AL, Venter L, Espie IW, Coetzee ML. *Mycobacterium tuberculosis* infections in eight species at the National Zoological Gardens of South Africa, 1991-2001. *J Zoo Wildl Med* 2003; 34: 364-70.

Michel AL, Simões M. Comparative field evaluation of two rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in African buffaloes (*Syncerus caffer*). *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127: 186-9.

Mitchell RM, Schukken Y, Koets A, Weber M, Bakker D, Stabel J, Whitlock RH, Louzoun Y. Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in cattle. *Vet Res* 2015; 46: 66.

Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. The tuberculin test. *Vet Microbiol* 1994; 40: 111-24.

Monreal L, Segura D, Segalés J, Garrido JM, Prades M. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in a mare. Vet Rec 2001; 149: 712-4.

Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol 1994; 40: 153-77.

Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney JP, Woodroffe R. Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. Independent Scientific Group on Cattle TB. Vet Rec 2000; 146: 236-42.

Moser I, Köhler H, Menge C. Die Tuberkulose des Rindes–überraschend wieder oder immer noch präsent? Tierärztliche Praxis Großtiere 2014; 4

Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Infect Dis 2002; 186: 74-80.

Nakatani SM, Burger M, Assef MC, Brockelt SR, Cogo LL, Messias-Reason JJ. Efficient method for mycobacterial DNA extraction in blood cultures aids rapid PCR identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 851-4.

Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Vet Microbiol 2008; 127: 1-9.

Nebreda T, Álvarez-Prida E, Blanco B, Remacha M, Samper S, Jiménez M. Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. IDCases 2016; 4: 50-2.

Neill SD, O'Brien JJ, McCracken RM. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. Vet Rec 1988; 122: 184-6.

Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *Vet Rec* 1989; 124: 269-71.

Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994; 40: 41-52.

Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001; 81: 79-86.

Neill SD, Skuce RA, Pollock JM. Tuberculosis - new light from an old window. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1261-9.

Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P (1992) Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie, 2. Auflage edn. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Nieberle K (1938) Tuberkulose und Fleischhygiene. G. Fischer Verlag., Stuttgart

Niemann S, Richter E, Rüschoff S. Biochemical and genetic evidence for the transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 433-6.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994; 264: 382-8.

Nugent G, Buddle BM, Knowles G. Epidemiology and control of *Mycobacterium bovis* infection in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*), the primary wildlife host of bovine tuberculosis in New Zealand. *N Z Vet J* 2015; 63 Suppl 1: 28-41.

O'Brien DJ, Schmitt SM, Fierke JS, Hogle SA, Winterstein SR, Cooley TM, Moritz WE, Diegel KL, Fitzgerald SD, Berry DE, Kaneene JB. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. *Prev Vet Med* 2002; 54: 47-63.

O'Reilly LM, Daborn CJ. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 1995; 76 Suppl 1: 1-46.

Odumeru J, Gao A, Chen S, Raymond M, Mutharia L. Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. *Can J Vet Res* 2001; 65: 201-5.

OIE. Bovine tuberculosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*: 2009:

Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, Cudjoe KS, Hornes E, Ugelstad J, Uhlen M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 43-54.

Opsteegh M, Langelaar M, Sprong H, den Hartog L, De Craeye S, Bokken G, Ajzenberg D, Kijlstra A, van der Giessen J. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int J Food Microbiol* 2010; 139: 193-201.

Pallaske G (1961) *Pathologische Anatomie und Pathogenese des spontanen Tuberkulose der Tiere*. G. Fischer Verlag., Stuttgart

Palmer MV, Waters WR, Thacker TC. Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol* 2007; 44: 863-74.

Pankhurst QA, Connolly J, Jones SK, Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics* 2003; 36: R167.

Parra A, Fernández-Llario P, Tato A, Larrasa J, García A, Alonso JM, Hermoso de Mendoza M, Hermoso de Mendoza J. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol* 2003; 97: 123-33.

Parra A, García N, García A, Lacombe A, Moreno F, Freire F, Moran J, Hermoso de Mendoza J. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 2008; 127: 315-24.

Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998; 6: 107-12.

Parsons S, Smith SG, Martins Q, Horsnell WG, Gous TA, Streicher EM, Warren RM, van Helden PD, Gey van Pittius NC. Pulmonary infection due to the *dassie bacillus* (*Mycobacterium tuberculosis* complex sp.) in a free-living dassie (rock hyrax-*Procavia capensis*) from South Africa. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88: 80-3.

Parsons SD, Warren RM, Ottenhoff TH, Gey van Pittius NC, van Helden PD. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in dogs in a high-risk setting. *Res Vet Sci* 2012; 92: 414-9.

Pate M, Svara T, Gombac M, Paller T, Zolnir-Dovc M, Emersic I, Prodinger WM, Bartos M, Zdovc I, Krt B, Pavlik I, Cvetnić Z, Pogacnik M, Ocepek M. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 387-92.

Pavlik I, Dvorska L, Bartos M, Parmova I, Melicharek I, Jesenska A, Havelkova M, Slosarek M, Putova I, Martin G. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in the Czech Republic and Slovakia in the period 1965-2001 studied by spoligotyping. VETERINARNI MEDICINA-PRAHA- 2002; 47: 181-94.

Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. Clin Infect Dis 2009; 49: 1350-7.

Piddington DL, Fang FC, Laessig T, Cooper AM, Orme IM, Buchmeier NA. Cu,Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis* contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. Infect Immun 2001; 69: 4980-7.

Pirson C, Engel R, Jones GJ, Holder T, Holst O, Vordermeier HM. Highly Purified Mycobacterial Phosphatidylinositol Mannosides Drive Cell-Mediated Responses and Activate NKT Cells in Cattle. Clinical and Vaccine Immunology 2015; 22: 178-84.

Plain KM, Waldron AM, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Whittington RJ. Efficient, validated method for detection of mycobacterial growth in liquid culture media by use of bead beating, magnetic-particle-based nucleic acid isolation, and quantitative PCR. J Clin Microbiol 2015; 53: 1121-8.

Pollock JM, Pollock DA, Campbell DG, Girvin RM, Crockard AD, Neill SD, Mackie DP. Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle. Immunology 1996; 87: 236-41.

Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. Immune responses in bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2001; 81: 103-7.

Pollock JM, Neill SD. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet J 2002; 163: 115-27.

Price RM. Milk and Its Relation to Tuberculosis. Canadian Public Health Journal 1934; 25: 13-5.

Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schönbauer M, Glawischnig W. Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. J Clin Microbiol 2002; 40: 2270-2.

Prodinger WM, Indra A, Koksalan OK, Kilicaslan Z, Richter E. *Mycobacterium caprae* infection in humans. Expert Rev Anti Infect Ther 2014; 12: 1-13.

Pucken VB, Götz F, Mansfeld R, Moder S, Sauter-Louis C, Straubinger RK, Knubben-Schweizer G. The intradermal tuberculin test: literature, directive and implementation in practice. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2015; 43: 197-206.

Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. Immunity 1994; 1: 509-16.

Ramos DF, Silva PE, Dellagostin OA. Diagnosis of bovine tuberculosis: review of main techniques. Braz J Biol 2015; 75: 830-7.

Reddington K, O'Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T. A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. PLoS One 2011; 6: e23481.

Reed G. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1957: 703-4.

Rehren G, Walters S, Fontan P, Smith I, Zárraga AM. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 2007; 87: 347-59.

Rettinger A, Broeckl S, Fink M, Prodinger WM, Blum H, Krebs S, Domogalla J, Just F, Gellert S, Straubinger RK, Büttner M. The Region of Difference Four is a Robust Genetic Marker for Subtyping *Mycobacterium caprae* Isolates and is Linked to Spatial Distribution of Three Subtypes. Transbound Emerg Dis 2015;

Reynolds D. A review of tuberculosis science and policy in Great Britain. Vet Microbiol 2006; 112: 119-26.

RindTb-VO (2014) Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung),. 388

Ritacco V, López B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Res Vet Sci 1991; 50: 365-7.

Robert-Koch-Institut. Tuberkulose - Therapie. In: RKI-Ratgeber für Ärzte: 2013:

Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci 2014; 97 Suppl: S5-s19.

Rodríguez E, Sánchez LP, Pérez S, Herrera L, Jiménez MS, Samper S, Iglesias MJ. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13: 1536-41.

Rodriguez JG, Mejia GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology 1995; 141 (Pt 9): 2131-8.

Rodríguez S, Bezos J, Romero B, de Juan L, Álvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Javed MT, Sáez-Llorente JL, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. Emerg Infect Dis 2011; 17: 532-5.

Rogall T, Flohr T, Böttger EC. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. J Gen Microbiol 1990; 136: 1915-20.

Romero B, Rodríguez S, Bezos J, Díaz R, Copano MF, Merediz I, Mínguez O, Marques S, Palacios JJ, García de Viedma D, Sáez JL, Mateos A, Aranaz A, Domínguez L, de Juan L. Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. Emerg Infect Dis 2011; 17: 2393-5.

Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust Vet J 1990; 67: 134-7.

Runyon EH. Source of scotochromogens. Am Rev Respir Dis 1959; 80: 277-8.

Sakamoto K. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Veterinary Pathology Online 2012; 49: 423-39.

Sakamoto K, Kim MJ, Rhoades ER, Allavena RE, Ehrt S, Wainwright HC, Russell DG, Rohde KH. Mycobacterial trehalose dimycolate reprograms macrophage global gene expression and activates matrix metalloproteinases. Infect Immun 2013; 81: 764-76.

Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Whelan AO, Coad M, Gormley E, Buddle BM, Palmer M, Thacker T, McNair J, Welsh M, Hewinson RG, Oesch B. Bovine tuberculosis: effect of the tuberculin skin test on in vitro interferon gamma responses. *Vet Immunol Immunopathol* 2010a; 136: 1-11.

Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer MV, Harris BN, Orloski KA, Buddle BM, Thacker TC, Lyashchenko KP, Waters WR. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis* 2010b; 57: 205-20.

Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* 1990; 144: 2771-80.

Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 1994; 152: 4070-9.

Schlesinger LS, Kaufman TM, Iyer S, Hull SR, Marchiando LK. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol* 1996; 157: 4568-75.

Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679-91.

Schmidt V, Schneider S, Schlömer J, Krautwald-Junghanns ME, Richter E. Transmission of tuberculosis between men and pet birds: a case report. *Avian Pathol* 2008; 37: 589-92.

Schoepf K, Prodinger WM, Glawischnig W, Hofer E, Revilla-Fernandez S, Hofrichter J, Fritz J, Köfer J, Schmoll F. A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. ISRN Vet Sci 2012; 2012: 245138.

Schöning JM, Cerny N, Prohaska S, Wittenbrink MM, Smith NH, Bloemberg G, Pewsner M, Schiller I, Origgi FC, Ryser-Degiorgis MP. Surveillance of bovine tuberculosis and risk estimation of a future reservoir formation in wildlife in Switzerland and Liechtenstein. PLoS One 2013; 8: e54253.

Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996; 2: 662-7.

Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P (2015) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre, 10 edn. Enke Verlag, Stuttgart. 304-13

Sevilla IA, Garrido JM, Molina E, Geijo MV, Elguezaabal N, Vazquez P, Juste RA. Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. Appl Environ Microbiol 2014; 80: 3757-68.

Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: 884-901.

Silva C, Ekizlerian S, Fazioli R. Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. The American journal of pathology 1985; 118: 238.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 463-96.

Smith NH, Gordon SV, de la Rua-Domenech R, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. Nat Rev Microbiol 2006; 4: 670-81.

Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 537-44.

Smith NH, Berg S, Dale J, Allen A, Rodriguez S, Romero B, Matos F, Ghebremichael S, Karoui C, Donati C, Machado Ada C, Mucavele C, Kazwala RR, Hilty M, Cadmus S, Ngandolo BN, Habtamu M, Oloya J, Muller A, Milian-Suazo F, Andrievskaia O, Projahn M, Barandiarán S, Macías A, Muller B, Zanini MS, Ikuta CY, Rodriguez CA, Pinheiro SR, Figueroa A, Cho SN, Mosavari N, Chuang PC, Jou R, Zinsstag J, van Soolingen D, Costello E, Aseffa A, Proaño-Perez F, Portaels F, Rigouts L, Cataldi AA, Collins DM, Boschirola ML, Hewinson RG, Ferreira Neto JS, Surujballi O, Tadyon K, Botelho A, Zárraga AM, Buller N, Skuce R, Michel A, Aranaz A, Gordon SV, Jeon BY, Källénus G, Niemann S, Boniotti MB, van Helden PD, Harris B, Zumárraga MJ, Kremer K. European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. Infect Genet Evol 2011; 11: 1340-51.

Smith NH. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. Infect Genet Evol 2012; 12: 857-65.

Somoskovi A, Dormandy J, Rivenburg J, Pedrosa M, McBride M, Salfinger M. Direct comparison of the genotype MTBC and genomic deletion assays in terms of ability to distinguish between members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates and in clinical specimens. J Clin Microbiol 2008; 46: 1854-7.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 9869-74.

Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, Singh HB, Sharma VD, Yadav VS, Sreekumaran, Thakral SS, Dharamdheeran JS, Nigam P, Prasad HK, Katoch VM. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India - possible relevance in human health. Indian J Med Res 2008; 128: 26-31.

Stahl DA, Urbance JW. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. J Bacteriol 1990; 172: 116-24.

Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, Bates JH. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. Am J Respir Crit Care Med 1995; 151: 1267-8.

Stewart LD, McNair J, McCallan L, Gordon A, Grant IR. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. PLoS One 2013; 8: e58374.

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science 1994; 263: 678-81.

Swift BM, Convery TW, Rees CE. Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteraemia in intradermal skin test positive cattle detected using phage-RPA. Virulence 2016: 1-10.

Tameni S, Amadori M, Scaccaglia P, Quondam-Giandomenico R, Tagliabue S, Achetti IL, Adone R, Ciuchini F. Quality controls and in vitro diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculins. *Biologicals* 1998; 26: 225-35.

Tar SY, Bozdemir B, Gurel MS, Bilgin FU, Baran MF, Demirkesen C. *Mycobacterium bovis caprae*: a rare agent of lupus vulgaris. *Clinical and experimental dermatology* 2009; 34: 532-3.

Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y. First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology* 2007a; 153: 1243-9.

Taylor GM, Worth DR, Palmer S, Jahans K, Hewinson RG. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Vet Res* 2007b; 3: 12.

Thakur A, Sharma M, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. *Indian J Microbiol* 2012; 52: 289-91.

Thoen CO, Hall MR, Tannis A, Petersburg BS, Harrington Jr R (1984) Detection of mycobacterial antibodies in sera of cattle experimentally exposed to *Mycobacterium bovis* by use of a modified enzyme-linked immunosorbent assay. *Proceedings of Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. 25-38

Thoen CO, Kaplan B, Thoen TC, Gilsdorf MJ, Shere JA. Zoonotic tuberculosis. A comprehensive ONE HEALTH approach. *Medicina (B Aires)* 2016; 76: 159-65.

TierSeuchAnzV (1991) Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 19.Juli 2011, die durch Artikel 3 der Verordnung vom 03. Mai 2016 geändert worden ist.

Toossi Z, Ellner JJ. Host response to *Mycobacterium tuberculosis*. Front Biosci 1998; 3: e133-40.

Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. Trends Immunol 2011; 32: 66-72.

Torres-Gonzalez P, Soberanis-Ramos O, Martinez-Gamboa A, Chavez-Mazari B, Barrios-Herrera MT, Torres-Rojas M, Cruz-Hervert LP, Garcia-Garcia L, Singh M, Gonzalez-Aguirre A, Ponce de Leon-Garduño A, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-Del-Valle M. Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7: e2177.

Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J Virol Methods 2007; 140: 115-23.

Trautwein G (2006) Tuberkulose. In G. Dirksen, H.-D. Gründer, M. Stöber (Eds.), Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Parey, Stuttgart

Trylich C. Diagnosis and No Visible Lesions in Tuberculosis of Cattle. Can Vet J 1960; 1: 545-50.

Tweddle NE, Livingstone P. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. Vet Microbiol 1994; 40: 23-39.

Ugelstad J, Berge A, Ellingsen T, Schmid R, Nilsen T-N, Mørk P, Stenstad P, Hornes E, Olsvik Ø. Preparation and application of new monosized polymer particles. Progress in Polymer Science 1992; 17: 87-161.

Une Y, Mori T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2007; 30: 415-25.

van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, van Soolingen D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 653-5.

van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J, Schouls LM, van Embden JD. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 1236-45.

Varello K, Pezzolato M, Mascarino D, Ingravalle F, Caramelli M, Bozzetta E. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *J Vet Diagn Invest* 2008; 20: 164-9.

Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem* 1997; 272: 13326-31.

Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Juste R, Barral M, Gortazar C. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet Res* 2006; 37: 107-19.

Vordermeier H, Whelan A, Hewinson G. The scientific case for the gamma-interferon Bovigam assay. *Government Veterinary Journal* 2008; 19: 38-43.

Wagner JC, Buchanan G, Bokkenheuser V, Leviser S. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 1958; 181: 284-5.

Wallgren A. The time-table of tuberculosis. *Tubercle* 1948; 29: 245-51.

Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol 1995; 43: 227-40.

Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. Clin Dev Immunol 2011; 2011: 768542.

WatreLOT-Virieux D, Drevon-Gaillot E, Toussaint Y, Belli P. Comparison of three diagnostic detection methods for tuberculosis in French cattle. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006; 53: 321-5.

Wells AQ. Tuberculosis in wild voles. The Lancet 1937; 229: 1221.

Welsh MD, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, Bryson DG, Pollock JM. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. Immunology 2005; 114: 101-11.

Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J Vet Diagn Invest 1996; 8: 351-4.

WHO. BCG vaccine. WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec 2004; 79: 27-38.

WHO (2015) Global Tuberculosis Report 2015

Wilson GJ, Carter SP, Delahay RJ. Advances and prospects for management of TB transmission between badgers and cattle. Vet Microbiol 2011; 151: 43-50.

Wood P, Jones S. BOVIGAMTM: An in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis 2001; 81: 147-55.

Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. Res Vet Sci 1990; 49: 46-9.

Yano I. The 72nd Annual Meeting Education Lecture. Cord factor. Kekkaku 1998; 73: 37-42.

Young JS, Gormley E, Wellington EM. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 1946-52.

Zanella G, Durand B, Hars J, Moutou F, Garin-Bastuji B, Duvauchelle A, Fermé M, Karoui C, Boschioli ML. *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. J Wildl Dis 2008; 44: 99-108.

VIII ANHANG

Anhang Abbildungen

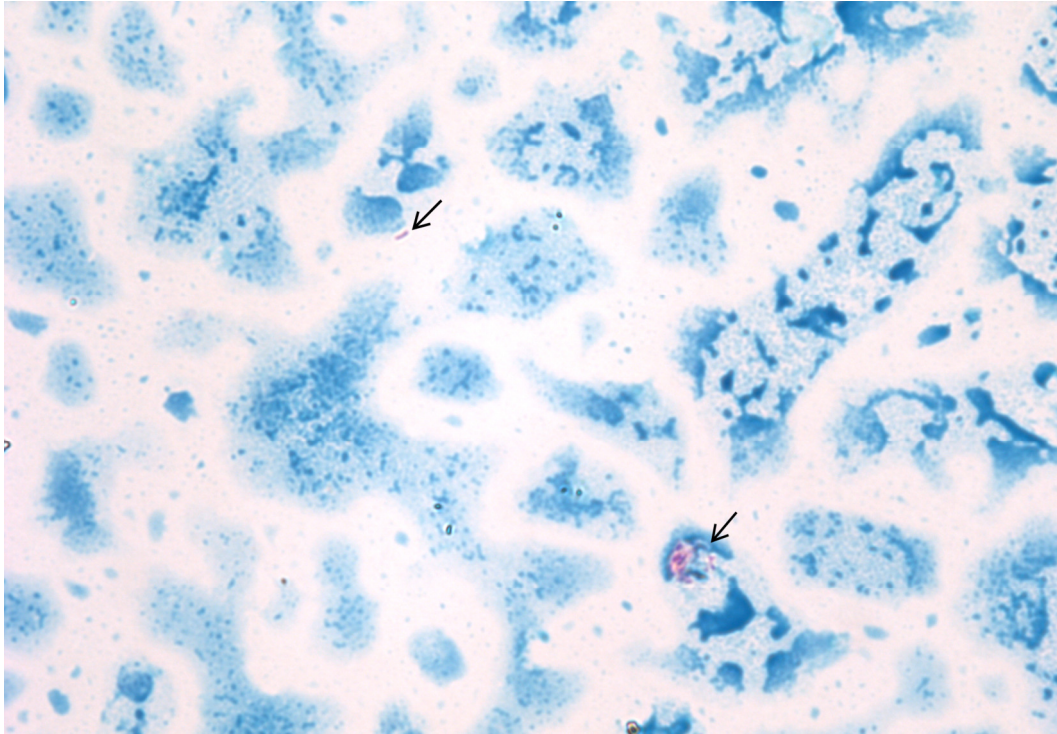


Abbildung A 1: Nach Ziehl-Neelsen gefärbter Ausstrich eines Sedimentes, welches zuvor mittels real-time PCR als MTC-DNA positiv detektiert wurde

Die Pfeile verweisen auf ein einzelnes säurefestes Stäbchen, bzw. ein Nest von säurefesten Stäbchen.

Die zellulären Strukturen außerhalb des Nestes lassen vermuten, dass das Mykobakterien-Nest vor dem Verdau intrazellulär gelegen war. Vermutlich handelt es sich bei der verdauten Zelle um eine Makrophage

Aufnahme bei 100-facher Vergrößerung mit Öl

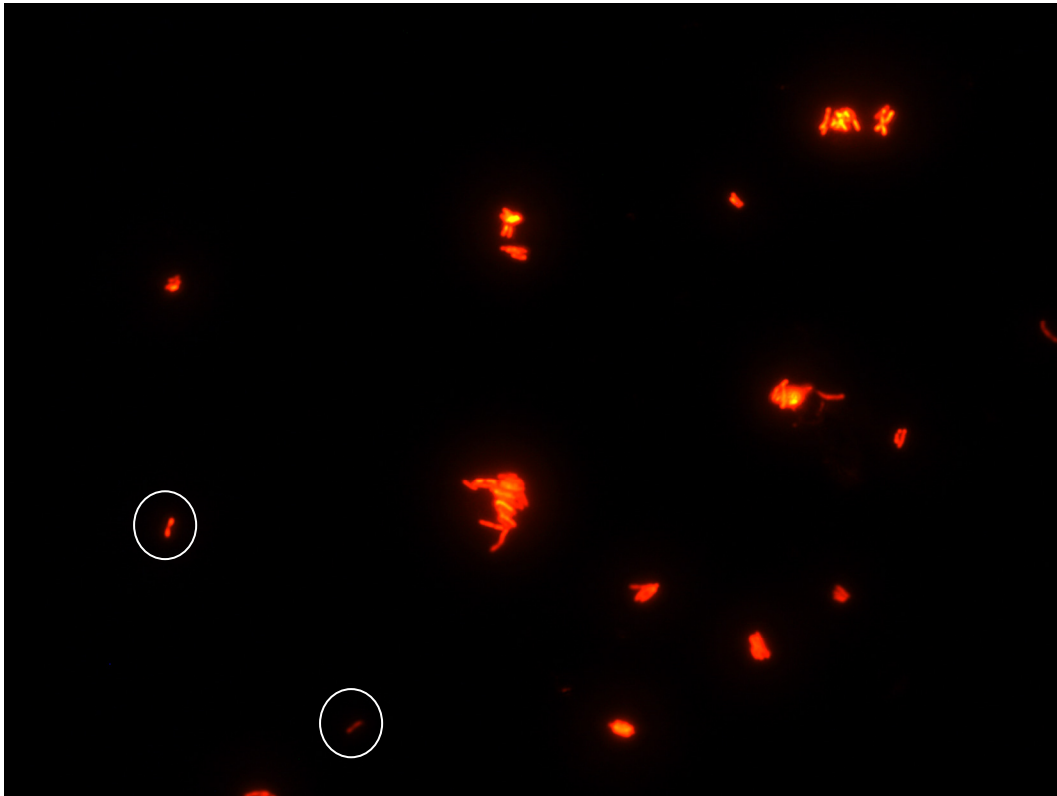


Abbildung A 2: Mit Auramin-Rhodamin gefärbter Ausstrich eines Sedimentes, welches zuvor mittels real-time PCR als MTC-DNA positiv detektiert wurde

Die weißen Kreise beinhalten säurefeste Stäbchen, die nicht kontinuierlich angefärbt sind, da sie vermutlich durch die vorausgegangene mechanische und enzymatische Aufbereitung so sehr beschädigt wurden, dass eine DNA Freisetzung möglich war.

Auch auf diesem Bild ist eine Zusammenlagerung der Mykobakterien erkennbar.

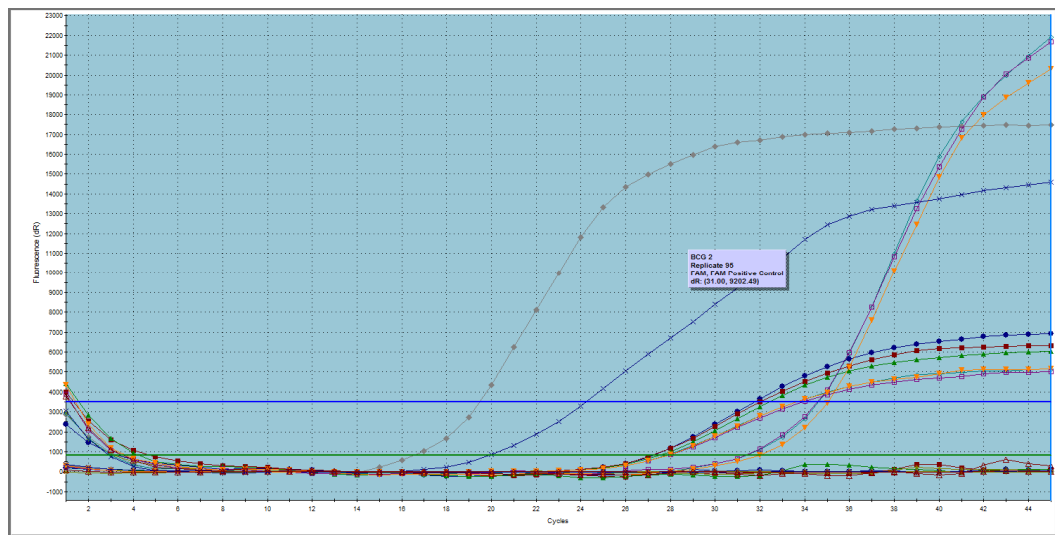


Abbildung A 3: Amplification plots der real-time PCR zur Differenzierung von *M. bovis* und *M. caprae* der Feldproben der MC 1 – 15

M. bovis BCG wurde als Kontrolle für die RD4- und MCAP-Differenzierung nach dem Protokoll der Amtlichen Methodensammlung verwendet. Die graue Kurve stellt die RD4-Amplitude für *M. bovis* BCG dar, die blaue, flacher verlaufende, veränderte Kurve stellt die MCAP-Amplitude für *M. bovis* BCG dar. Für die real-time PCR wurde der Stratagene MX3005 Cycler verwendet.

Qiagen: Quantitect Multiplex

02.02.2016

FAM

RD4_MCAP

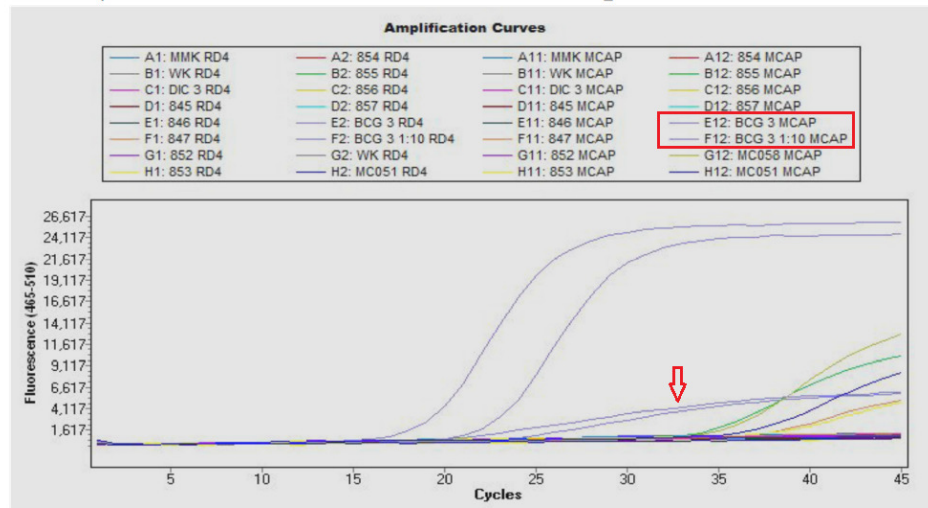


Abbildung A 4: Amplification plots der real-time PCR zur Differenzierung von verschiedenen *M.-bovis*- und *M.-caprae*-Isolaten

Auch bei Nutzung des Programms des Roche Light Cycler fallen die veränderten Amplituden für *M. bovis* BCG unter Verwendung der eigentlich *M.-caprae*-spezifischen MCAP-Sonde auf (durch roten Pfeil markiert)

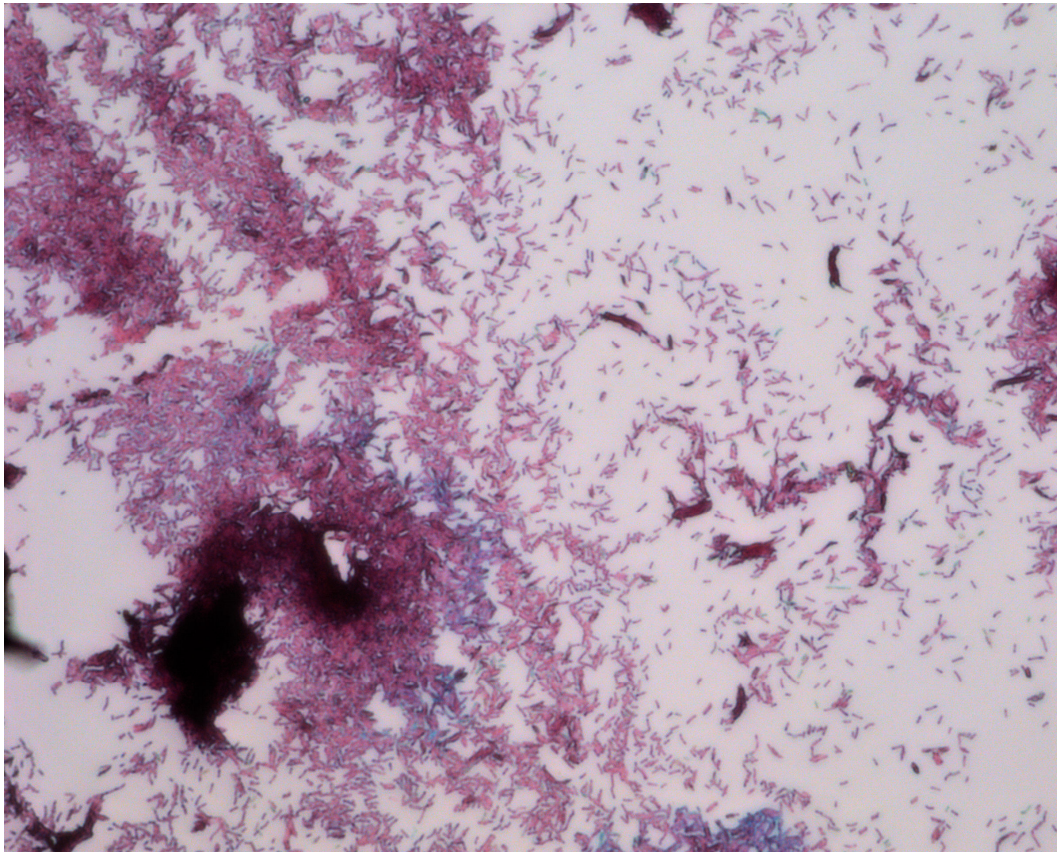


Abbildung A 5: Ziehl-Neelsen gefärbter Ausstrich von *M. bovis* BCG

Eine Öse Koloniematerial aus einer *M. bovis* BCG-Reinkultur wurde in einem Milliliter PBS gelöst und mit Lysis Matrix D für eine Minute gevortext und danach ein Tropfen der Suspension auf einem Objektträger ausgestrichen, gefärbt und mikroskopisch untersucht (100-fache Vergrößerung mit Öl).

Es sind zahlreiche säurefeste Stäbchen sichtbar, die teilweise miteinander Klumpen bilden.



Abbildung A 6: Ziehl-Neelsen gefärbter Ausstrich von *M. bovis* BCG nach Filtration

Eine Öse Koloniematerial aus einer *M. bovis* BCG-Reinkultur wurde in einem Milliliter PBS gelöst und mit Lysis Matrix D für eine Minute gevortext, mittels 5- μ m-Filter gefiltert und danach ein Tropfen der Suspension auf einem Objektträger ausgestrichen, gefärbt und mikroskopisch untersucht (100-fache Vergrößerung mit Öl).

Es sind deutlich weniger säurefeste Stäbchen sichtbar, die teilweise vereinzelt vorliegen, teilweise jedoch noch immer miteinander verklebt sind.

ANHANG TABELLEN**Tabelle A 1: Sequenzen für Primer und Sonde aus der Amtlichen Methodensammlung und der neuen, um zwei Basen verkürzten LNA Probe**

Name	Sequenz (5'-3')
MTC-MCAP f	AGA CCG TGC GGA TCT TG
MTC-MCAP r	CAT GGA GAT CAC CCG TGA
MTC-CAP-FAM	FAM-TAT CGG GTA CAC AAA GAC GA-BHQ1
LNA Probe MCAP	6FAM-TCGGGT+ACAC+AAAGACG-BHQ1

Das „+“ markiert die eingebauten LNAs

Tabelle A 2: C_t-Werte im Vergleich bei Anwendung der Sonde nach der Amtlichen Methodensammlung und der neu designten LNA Probe

	Amtliche Methode		LNA Probe
	RD4	MCAP	MCAP
<i>M. bovis</i> BCG 1:10	22.19	27.73	no C _t
RK <i>M. caprae</i> Allgäu	no C _t	20.11	20.57
RK <i>M. caprae</i> Lechtal	no C _t	20.16	20.35
RK <i>M. caprae</i> Karwendel	no C _t	19.54	20.41
RK <i>M. bovis</i> 1	20.66	27.93	no C _t
RK <i>M. bovis</i> 2	20.12	26.72	no C _t
NTC	no C _t	no C _t	no C _t

Unter Verwendung der LNA Probe werden DNA Extrakte aus *M. bovis* Reinkulturen nicht mehr fälschlicherweise als positiv detektiert

Real-time PCR am Cyclex MX3005, mit dem Mastermix Quantinova von Qiagen

RK - Reinkultur

NTC – no template control

Die richtigen Ergebnisse sind grün, die falschen rot markiert.

Tabelle A 3: Ergebnisse der Vorversuche zur Etablierung der Magnetic Capture Methode

		Amtliche Methode			Magnetic Capture		
Gewebe und Gewicht	Probe	C _t β -Aktin	C _t Heli	C _t IS 1081	C _t β -Aktin	C _t Heli	C _t IS 1081
Darmlymphknoten, 13.6 g	1	20.42	32.95	33.50	29.56	30.23	31.82
	2	21.87	35.77	36.02			
	3	20.40	no ct	no ct			
	4	21.13	31.20	32.45			
	5	22.61	no ct	no ct			
Darmlymphknoten, 11.8 g	1	19.96	no ct	no ct	28.45	33.48	34.92
	2	18.97	26.96	27.22			
	3	20.97	31.11	32.12			
	4	19.02	no ct	no ct			
	5	19.88	no ct	no ct			
Darmlymphknoten, 15.2 g	1	24.03	no ct	no ct	27.87	25.78	26.18
	2	22.85	no ct	no ct			
	3	20.36	28.21	26.79			
	4	19.93	no ct	no ct			
	5	21.73	no ct	no ct			
Lungenlymphknoten 7.6 g	1	19.64	no ct	no ct	25.57	29.67	30.33
	2	23.10	38.77	38.97			
	3	20.08	32.35	33.56			
	4	18.64	no ct	no ct			
	5	19.00	no ct	no ct			
Lungenlymphknoten 6.5 g	1	24.04	28.08	29.34	25.18	31.51	32.03
	2	23.36	no ct	no ct			
	3	17.77	no ct	no ct			
	4	21.75	no ct	no ct			
	5	20.57	24.78	25.96			

Fünf Lymphknoten verschiedenen Gewebsursprungs mit unterschiedlichem Gewicht wurden artifiziell mit *M. bovis* BCG beimpft (siehe Publikation, Abschnitt „Methods“).

Die Ergebnisse der real-time PCR sind in der Tabelle zusammengefasst und die ermittelten C_t-Werte ergeben sich als Durchschnittswerte aus einem Dreifachansatz pro Probe.

Von 25 Proben, die mittels des Protokolls aus der Amtlichen Methodensammlung untersucht werden, konnten nur zehn Proben (40 %) als MTC-DNA positiv erkannt werden, während mit der MC alle fünf Lymphknoten (100 %) als MTC-DNA positiv detektiert werden.

IX DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Straubinger, nicht nur für die Bereitstellung des interessanten Themas und die überdurchschnittlich gute Betreuung während der Doktorarbeit, aber auch für seinen lockeren und motivierenden Umgang, seinen nahezu grenzenlosen Optimismus und seine aufmunternden Worte in Zeiten, in denen mal nicht alles nach Plan verlief.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt auch meiner Betreuerin, Dr. Anna Lena Rettinger, die sich meiner zuerst verlorenen Seele annahm und mich in die Geheimnisse der mykobakteriellen Diagnostik einweihte. Neben der höchst kompetenten Beratung bezüglich der Doktorarbeit, war sie auch in den schweren Momenten des Paper-Schreibens und -Einreichens immer für mich da, half bei allen Problemlösungen und bereitete mich effektiv auf den weiteren beruflichen Werdegang vor. Auch die gemeinsamen Tagungen, Vortrags-/Vorlesungsvorbereitungen und Antragsstellungen waren, dank ihr, gut zu meistern.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie bedanken. Besonders hervorzuheben sind dabei Stephanie Hiereth und Astrid Thomas, die mich sowohl praktisch, als auch fachlich fleißig unterstützt haben. Nicht zuletzt bedanke ich mich besonders bei meinen Co-Doktoranden, Sandra Schwarzer und Christina Geiwagner, die mir den Arbeitsalltag durch freiwillige und unfreiwillige Komik und gemeinsamen Schabernack in der Mittagspause versüßt haben.

Zusätzlich möchte ich mich beim gesamten Tuberkulose-Verbund für die Kooperation und den regen Erfahrungs- und Informationsaustausch bedanken. Dabei bedanke ich mich vor allem bei allen Co-Autoren des Papers für die konstruktive Kritik und beim LGL, insbesondere Prof. Matthias Büttner und Stephanie Bröckl, für die Bereitstellung und Vorbereitung der Proben und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern kann ich nicht genug danken und auch nicht annähernd ausdrücken, wie dankbar ich bin, dass sie mir alles ermöglicht haben, was ich mir vorgenommen habe! Ohne ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ihr Vertrauen

in mich, ihren dauerhaften Rückhalt und unzählige aufmunternde und motivierende Telefonate, wären das Studium der Tiermedizin und der Dokortitel wohl niemals möglich gewesen! Auch meiner Schwester Sonja mit Alexander, Max und Mia möchte ich für die Unterstützung und Motivation, aber auch Ablenkung danken, die man in Hochphasen der Doktorarbeit auch mal dringend benötigt.

Flo, dir danke ich für dein Verständnis, deine Unterstützung und deine Geduld, besonders in der Endphase der Doktorarbeit. Ohne dich und Leni wäre mein Leben in Rosenheim nicht mal annähernd so schön.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die teilweise durch die gleiche anstrengende Zeit wie ich gegangen sind und mich immer noch an die schönen Dinge des Lebens erinnert haben, wie Sonnenbaden am Eisbach, Sport im Englischen Garten, Konzerte oder auch mal die ein oder anderen Party am Wochenende! Vielen Dank Teresa, Julia, Anne, Tini, Steffi und Simona.